

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ВІДДІЛЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЇ ГОРЮЧИХ КОПАЛИН  
ІНСТИТУТУ ФІЗИКО-ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА ВУГЛЕХІМІЇ  
ім. Л.М. ЛИТВИНЕНКА  
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

*Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису*

**ПОКИНЬБРОДА ТЕТЯНА ЯРОСЛАВІВНА**

УДК 604.2:61.185 (043.3)

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**«БІОТЕХНОЛОГІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ**  
**БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*, ЇХ ВЛАСТИВОСТІ ТА**  
**ЗАСТОСУВАННЯ»**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук.  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

\_\_\_\_\_ Т.Я. Покиньброда

Науковий керівник: **Карпенко Олена Володимирівна**, д.т.н., с.н.с.

Львів – 2018

## АНОТАЦІЯ

*Покинъброда Т.Я.* Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2018.

Поверхнево-активні речовини (ПАР) широко використовуються у сучасній промисловості, сільському господарстві, відновленні довкілля, медицині. Проте синтетичні ПАР є екологічно небезпечними. Переваги продуктів мікробного синтезу (біоПАР, біосурфактантів) – висока ефективність, стійкість у широких діапазонах температури, рН, біологічна активність, а водночас біодеградабельність і низька токсичність.

Актуальним завданням нових технологій мікробних ПАР є пошук активних продуцентів, що синтезують сурфактанти на недорогій сировині, та оптимізація їх виробництва. Серед перспективних продуцентів заслуговують уваги представники роду *Pseudomonas*, які синтезують позаклітинні сурфактанти з високою поверхневою, емульгувальною і піноутворювальною активністю. Проте, висока вартість виробництва біосурфактантів (біосинтез й витрати на виділення й очищення) лімітує економічну доступність та знижує їх конкурентоспроможність з синтетичними. Крім того, все ще недостатньо охарактеризовані їх фізико-хімічні та біологічні властивості, що необхідні для оцінки практичного потенціалу у конкретних галузях. Показники емульгування, піноутворення, міцелоутворення є важливими для трактування ролі біоПАР у мийних засобах, модифікації різних поверхонь, регулювання транспорту біологічно

активних речовин, витиснення нафти тощо. Отже, розроблення раціональних технологій рамноліпідних ПАР та визначення функціональних властивостей дозволить створити нові альтернативні продукти – ефективні й екологічно безпечні, які зможуть успішно замінити синтетичні ПАР у сучасних технологіях.

**Метою роботи** є розроблення біотехнології отримання поверхнево-активних речовин штамів *Pseudomonas* шляхом оптимізації умов культивування та виділення цільових продуктів, дослідження їх основних фізико-хімічних і біологічних властивостей та практичного потенціалу.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні задачі:

- провести скринінг штамів *Pseudomonas* за здатністю до синтезу ПАР;
- вивчити процеси синтезу біоПАР обраними штамами *Pseudomonas* з використанням різних субстратів, зокрема економічно вигідних та сумішей;
- визначити раціональні умови синтезу ПАР штамів *Pseudomonas*, способи їх виділення, визначити склад продуктів;
- розробити технологічну схему одержання рамноліпідних ПАР – продуктів синтезу перспективного штаму-продуценту роду *Pseudomonas*;
- дослідити фізико-хімічні і біологічні властивості біоПАР штамів *Pseudomonas*;
- визначити особливості застосування поверхнево-активних продуктів штамів *Pseudomonas* у промисловості та сільському господарстві.

**Об'єкт дослідження** – біотехнології мікробного синтезу поверхнево-активних речовин.

**Предмет дослідження** – біотехнологічні параметри одержання поверхнево-активних продуктів штамів роду *Pseudomonas*, їх функціональні властивості, застосування у промисловості, сільському господарстві, охороні довкілля.

**Методи досліджень.** В експериментах використано мікробіологічні, біотехнологічні, хімічні, фізико-хімічні, спектральні, математичні методи.

В результаті скринінгу знайдено нові продуценти ПАР – штами *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1, які синтезують ПАР двох типів – рамноліпіди та ліпопептиди. Встановлено ефективність застосування змішаних субстратів, відходів виробництв, рослинних олій для синтезу ПАР *P. aureofaciens* NB-1, *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas* sp. PS-17. Вихід ПАР на суміші гексадекан-гліцерин 1:6 зростає у 1,8 разів за скорочення тривалості синтезу на 3 доби. Оптимізовано умови синтезу ПАР на прикладі штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, підібрано склад інокуляційного та ферментаційного поживних середовищ (співвідношення C:N – 14:1 та 18:1 відповідно). На основі експериментальних даних та математичного моделювання визначено оптимальні розчинники для екстракції ПАР штамів *Pseudomonas* (спирти та естери). Встановлено, що для виділення рамноліпідів штамів *Pseudomonas* sp. PS-17 та *P. fluorescens* 8573 доцільно використовувати кислотне осадження з нагріванням СКР, що збільшує вихід РБК на 20 %. При дослідженні впливу рН на екстракцію ПАР штаму *P. aureofaciens* NB-найбільший вихід ліпідів (3,7 г/дм<sup>3</sup>) досягнуто за рН 11 за використання сумішшю етилацетату й ізопропанолу (2:1). Раціональними формами цільових продуктів штамів *P. aureofaciens* NB-1, *P. fluorescens* 8573, *Pseudomonas* sp. PS-17 є культуральна рідина, супернатант культуральної рідини, рамноліпідний біокомплекс, рамноліпіди, надосадова рідина після осадження РБК, полігідроксикарбоксилати. Розроблена технологія дозволила зменшити відходи постферментаційної культуральної рідини. Поряд з цим показано можливість практичного використання економічно вигідного продукту – НОР. Визначено високу активність та низьку токсичність отриманих ПАР (поверхневий натяг 26,5-28,5 мН/м, ККМ дирамноліпиду 138 мг/ дм<sup>3</sup>, емульгувальна здатність (E<sub>24</sub> 50-100%), піноутворення (стійкість піни 50-90 %), змочування поверхонь), а також їх вплив на проникність клітинних мембран різних мікроорганізмів. ПАР штамів *Pseudomonas* мають антимікробну дію щодо фітопатогенних бактерій і грибів. Доведена можливість практичного застосування



компонентів постферментаційної культуральної рідини штамів *Pseudomonas*. БіоПАР є ефективними для інтенсифікації очистки ґрунтів від нафтових вуглеводнів, зокрема швидкість розкладу бензпірену зростала за дії рамноліпілів 18 %. СКР штамів *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1 є екологічно безпечними інгібіторами корозії сталі Ст3 – ступінь захисту становить 80-95%. Вперше встановлено ефективність рамноліпідних ПАР для «зеленого» синтезу наночастинок (середній діаметр одержаних AgNP – 40-50 нм). Доведено перспективність застосування ПАР у рослинництві як регуляторів росту рослин (при передпосівному обробленні насіння надземна маса рослин зростає у середньому на 19 %, а коренева – на 30 %. Розроблено технологію та запропоновано апаратурно-технологічну схему промислового виробництва ПАР штаму *P. fluorescens* 8573, особливостями якої є застосування ферментера з вихровою системою аерації. Дана технологія дозволяє одержати 5 цільових продуктів для практичного застосування та мінімізувати кількість відходів переробки культуральної рідини.

Практичне значення результатів засвідчено відповідними актами впровадження та патентами України: UA № 71792 А 15.12.2004, UA № 36704, 10.11.2008.

За результатами досліджень опубліковано 38 наукових праць, у тому числі 12 статей у наукових фахових виданнях, з них 2 статті у виданнях іноземних держав, 2 статті у вітчизняних журналах, які представлено у наукометричних базах, 2 патенти України, 21 теза доповідей на конференціях.

**Ключові слова:** *Pseudomonas*, біоПАР, рамноліпіди, фізико-хімічні і біологічні властивості, інгібітори корозії, препарати для рослин, антимікробна дія.

## SUMMARY

*Pokynbroda T.Ya.* Biotechnology of surface-active products of the bacteria of *Pseudomonas* genus, their properties and application. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for the degree of a candidate of technical sciences in the specialty 03.00.20 – biotechnology. – Department of Physical Chemistry of Fossil Fuels InPOCC of National Academy of Sciences of Ukraine. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute” (Ministry of Education and Science of Ukraine). Kyiv, 2018.

Surfactants are widely used in modern industry, agriculture, environmental restoration, medicine. However, synthetic surfactants are environmentally hazardous. Advantages of products of microbial synthesis (biosurfactants) are high efficiency, stability in various temperatures and pH, biological activity, as well as biodegradability and low toxicity.

The actual task for new biosurfactants technologies is to search active surfactant producers, inexpensive raw materials and optimizing their production. Microorganisms of the genus *Pseudomonas* deserve attention among promising producers, which synthesize extracellular surfactants with high surface, emulsifying and foaming activity. However, the high cost of biosurfactants production (biosynthesis, isolation, purification processes) limit economic accessibility and reduces their competitiveness with synthetic ones. In addition, their physico-chemical and biological properties of biosurfactants, which are necessary for assessing the practical potential in specific fields, are still insufficiently characterized. The parameters of emulsification, foaming, micelle formation are important data for the treatment of the biosurfactants role in detergents, for surface modification, regulation of the transport of biologically active substances, for degradation of petroleum contaminations. So, the development of rational biosurfactants technologies and the functional properties definition will promote creation new alternative products – effective and

environmentally safe. Such bioproducts can successfully replace synthetic surfactants in modern technologies.

**The aim** of the work was the development of biotechnology for production of surfactants of *Pseudomonas* strains by optimizing the conditions of the synthesis and isolation, studying their physico-chemical, biological properties, establishment of the practical potential.

To achieve this goal it is necessary to solve the following **tasks**:

- conduct screening of *Pseudomonas* strains for their ability to synthesize surfactants;
- to study processes of the biosurfactants synthesis by selected strains of *Pseudomonas* using various substrates, in particular, economically viable and mixtures;
- to determine the rational conditions for the synthesis of biosurfactants *Pseudomonas* strains, methods for their isolation, to determine the composition of the products;
- to develop a technological scheme for the production of biosurfactants – products of the synthesis of a promising producer of the genus *Pseudomonas*;
- to investigate the physicochemical and biological properties of the biosurfactants of *Pseudomonas* strains;
- identify the features of the use of surface-active products of *Pseudomonas* strains in industry and agriculture.

**The object** of study is biotechnology of microbial synthesis of surface-active substances.

**The subject** of research is the biotechnological parameters of the biosurfactants of *Pseudomonas* strains, their functional properties, application in industry, agriculture, environmental protection.

**The methods.** Microbiological, biotechnological, chemical, physical-chemical, spectral, mathematical methods were used in experiments.

The new, promising producers of surfactants – the strains of *P. fluorescens* 8573 and *P. aureofaciens* NB-1 were selected. It was shown that these strains synthesize the surfactants of two types – rhamnolipids and lipopeptides. Methods for increasing the efficiency of surfactants biosynthesis by the *Pseudomonas* strains have been developed. Efficiency of the mixed substrates using was established: the yield of products was significantly increased. Rational methods of isolation and extraction of surfactants, in particular by mathematical methods have been developed. The use of a new cheap product – supernatant after biocomplex precipitation (SLC), which is a by-product, has been proposed. The ability of surfactant of *Pseudomonas* sp. PS-17 to activate the benzpyrene biodegradation has been established. The products of *P. fluorescens* 8573 and *P. aureofaciens* NB-1 can inhibit the metals corrosion of and stimulate plant growth. Also, the rhamnolipids efficiency for the "green" synthesis of silver nanoparticles has been shown.

The technologies for the preparation of surface-active products using strains *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1 and *Pseudomonas* sp. PS-17, including economically viable (vegetable oils, waste from biodiesel production) and mixed substrates, an instrument-technological scheme for the production of biosurfactants was proposed. The rational ways of isolating biosurfactants have been developed; they can be recommended for industrial production. The perspectives of using rhamnolipid surfactants as environmentally safe inhibitors of metal corrosion, as well as the mean for plant growing and protection were established. The practical significance of the results is confirmed by appropriate implementation acts and Patents of Ukraine. It was shown that the using of mixed substrates contributed to the increased yields of the products if compared to the media with monosubstrates. When using the mixture of glycerol with hexadecane as carbon sources the final concentration of surfactants has been increased by 1,8 times and the duration of the synthesis has been shorter by 3 days. The processes of biosurfactants separation were optimized: precipitation of the biocomplexes from post-fermentative culture liquid supernatant (CLS) by adjusting temperature

regime. The optimal solvents for the rhamnolipid surfactants extraction from biocomplexes and CLS were determined by the mathematical method of linear multiparameter equations. The main physico-chemical and biological properties of the obtained biosurfactants of the *Pseudomonas* strains were established: emulsification, solubilization of various hydrophobic substances, surface activity, wetting of different surfaces, the biosurfactants influence on the permeability of cell membranes of microorganisms, their low toxicity. The antimicrobial activity of surfactants against phytopathogen bacteria and fungi was shown. A regulating influence of the synthesized surfactants on the growth of various plants was established. Therefore prospects of the obtained biosurfactants using in modern agriculture for the means of plant growth and plant protection were shown. Biosurfactants are effective for intensifying the remediation of soils from petroleum hydrocarbons. In particular, the rate of the benzpyrene degradation increased by 18% under the influence of rhamnolipids. It was shown that CLS of strains *P. fluorescens* 8573 and *P. aureofaciens* NB-1 are environmentally safe steel corrosion inhibitors – the degree of protection is 80-95%. The technology process, the flow and equipment diagrams for the industrial production of the biosurfactants of *P. fluorescens* 8573 strain were developed. This technology allows obtaining 5 types of target products for practical using. The proposed approach allowed to minimize the by-products of processing of the culture liquid. The non-waste production with the use of practically all of the components of postfermentation CLS, eliminating extraction with solvents was suggested. The results indicate the environmental and economic advantages of the developed technology.

The practical significance of the results is confirmed by the relevant implementation certificates and patents of Ukraine: UA No. 71792 A December 15, 2004, UA No. 36704, November 10, 2008.

On the dissertation theme 38 works were published: 12 scientific articles (including 2 articles in foreign journals, 2 - in domestic journals, presented in

international science databases), 2 articles in others editions, 2 Patents of Ukraine, 21 proceeding of conferences.

**Key words:** *Pseudomonas*, biosurfactants, rhamnolipids, physico-chemical and biological properties, corrosion inhibitors, plant growth regulators, antimicrobial activity.

#### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Покинсьброда Т. Я., Хом'як С. В., Швед О. В., Парашин Ж. Д., Комаровська-Порохнявець О. З., Карпенко О. В., Вільданова-Марцишин Р. І., Федоришин Ю. І., Наконечний М. В., Новіков В. П. Очистка ґрунтів від нафтових забруднень біотехнологічними шляхами. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2002. № 461. С. 208-211 (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2).

2. Єрохін В. А., Покинсьброда Т. Я., Карпенко О. В., Новіков В. П. Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом *Pseudomonas species* PS-17 – продуцента позаклітинних біосурфактантів. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2006. № 553. С. 124-127. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2).

3. Щеглова Н.С., Карпенко О. В., Покинсьброда Т.Я. Лубенець В.І., Швед О.В.. Гліколіпідні ПАР – екологічно безпечні стимулятори росту сільськогосподарських рослин. *Вісник НУ «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2007 №590. С.133-138 (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2).

4. Малаховська-Ютш А., Покинсьброда Т., Карпенко Е. Деградація бензпирена почвенними мікроорганізмами в присутствіи гліколипидов,

синтезированных штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17. *Биотехнология*. 2007. № 3. С. 68 – 73 (Російська Федерація).

5. Єрохін В. А., Покинсьброда Т. Я., Карпенко О. В. Поверхнево-активні препарати на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. *Наукові праці Донецького національного технічного університету. Серія: Хімія і хімічна технологія*. 2008. №134 (10). С. 111-117. Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 30.06.2004 р. №3-05/7).

6. Єрохін В. А., Карпенко О. В., Покинсьброда Т. Я., Лубенець В. І. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов мікробного синтезу поверхнево-активних речовин. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2008. № 609. С. 135-140. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2).

7. Підбір оптимальних екстрагентів біологічно активних сполук на основі принципу лінійності вільних енергій. Т. Я. Покинсьброда, О. В. Карпенко, Р. Г. Макітра, О. Я. Пальчикова, Н. В. Роговик, В. І. Роговик. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2008. № 622. С. 103-106. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно постанови президії ВАК України від 09.02.2000 р. №2-02/2).

8. Покинсьброда Т.Я., Пирог Т.П., Карпенко О.В., Пристай М.В., Болібрух Л. Д. Синтез поверхнево-активних речовин штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на змішаних субстратах. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2016. № 841. С. 210-217. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України від 13.07.2015 р. №. 747).

9. Kłosowska-Chomiczewska I.E., Mędrzycka K., Hallmann E., Karpenko E., Pokynbroda T., Macierzanka A., Jungnickel C. Rhamnolipid CMC prediction.

*Journal of Colloid and Interface Science*. 2017. Vol. 488. P. 10-19. (Журнал включено до таких баз даних: **Scopus**, AGRICOLA, Biological Abstracts, Chemical Abstracts тощо).

10. Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Зінь І.М. Нові поверхнево-активні речовини штаму *Pseudomonas aureofaciens* NB-1. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 3(113). С. 71-76. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України від 13.07.2015 р. №. 747. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, WorldCat, J-Gate, Google Scholar тощо).

11. Карпенко О.В., Волошинець В.А., Карпенко І.В., Семенюк І.В., Мідяна Г.Г., Покинсьброда Т.Я. Колоїдні характеристики водних систем рамноліпідного біокомплексу штаму *Pseudomonas sp.* PS-17 з TWEEN-80 та їх перспективи для біотехнології. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 6. С. 7-13. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України від 13.07.2015 р. №. 747. Входить до міжнародних наукометричних баз даних: DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, WorldCat, J-Gate, Google Scholar тощо).

12. Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Лубенець В. І., Мартинюк Н.Б., Зінь І.М. Біосинтез ПАР мікроорганізмами родів *Pseudomonas* на соєвій олії та дослідження їх властивостей. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2017. № 868. С. 222-229. (Наукове фахове видання України з технічних наук згідно наказу МОН України від 13.07.2015 р. №. 747).

13. Патент України на корисну модель № 71792 А. Поверхнево-активний біопрепарат. Карпенко О.В., Мартинюк Н.Б., Шульга О.М., Покинсьброда Т.Я., Вільданова-Марцишин Р.І., Щеглова Н.С. 24.01.2004, Бюл.12.

14. Патент України на корисну модель №36704. Біопрепарат для бобових і злакових рослин. Лісова Н.Ю., Карпенко О. В., Щеглова Н.С.,



Вільданова-Марцишин Р.І., Покинсьброда Т.Я., Козуб Ю.Б., Галан М.С., Наконечний М.В. 10.11.2008, Бюл. №21.

15. Karpenko E., Kolwzan B., Vildanova-Martysyshyn R., Scheglova N., Pokynbroda T., Grabas K. Method of remediation of soils from petroleum-products - enhanced cleaning by biosurfactants. *International Conf. on Bioremediation of Soil and Groundwater*, 5-8 September 2004. Sci. Mater. Cracow (Poland). 2004. P. 93.

16. Карпенко О., Вільданова-Марцишин Р., Щеглова Н., Покинсьброда Т., Шеремета Ю., Мартинюк Н., Брик Ж., Туровський А., Солтис М. Утилізація відходів нафтовидобувної промисловості – актуальна проблема Західного регіону. *Тези доп. 2 міжнар. конф. «Чистота довкілля в нашому місті»*. 2004. Трускавець. С.150-151.

17. Карпенко О.В., Колвзан Б., Грабас К., Щеглова Н.С., Покинсьброда Т.Я., Вільданова-Марцишин Р.І., Макітра Р.Г., Мартинюк Н.Б., Шеремета Ю.Б. Нові препарати для знешкодження відходів нафтовидобувної промисловості. *Тези доп. 2-ої Всеукр. наук.-практ. конф. “Біотехнологія. Освіта. Наука”*. Збірник наук. праць. Львів. 2004. С. 150-151.

18. Покинсьброда Т., Єрохін В., Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Лубенець В., Новіков В., Солтис М. Методи отримання поверхнево-активних ліпідів для нових фармпрепаратів. *Тези доп. 2-ої Всеукраїнської наук.-практ. конф. “Біотехнологія. Освіта. Наука”*. Збірник наук. праць. Львів. 2004. С.83.

19. Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Лісова Н., Покинсьброда Т., Туровський А. Регуляція синтезу полісахаридів азотфіксуючих бактерій. *Зб. наук. праць за матеріалами 10-ї наук. конф. «Львівські хімічні читання-2005»*, (Львів, 25-27 травня 2005 р.). М-во освіти і науки України, Львів, нац. універ. ім.Франка. Львів, видавнич. центр Львів. нац. універ. ім.Франка, 2005. С. Д8.

20. Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Шульга О., Покинсьброда Т., Туровський А. Екологічна роль поверхнево-активних

речовин мікробного походження. Зб. наук. праць 10-ї наук. конф. «Львівські хімічні читання-2005» . Львів, 25-27 травня 2005 р. М-во освіти і науки України, Львів. нац. універ. ім.Франка. Львів, видавнич. центр Львів. нац. універ. ім. Франка, 2005. С.

21.Karpenko E., Hafiychuk H., Pokynbroda T., Yerokhin V. Mathematical modeling and optimization of methabolic process in biotechnology. *Annual Conference in Ukraine. Statistical Physics 2005: Modern Problems and New Applications*. Book of abstracts. 28-30 August 2005. Lviv. P. 140.

22. Karpenko E., Kolwzan B., Pokynbroda T., Martynyuk N., Lubenets V., Grabas K., Novikov V., Gvozdjak P., Fedoryshyn Y. Biologiczne metody oczyszczania srodowiska z zanieczyszczen naftowych stosowane na Ukrainie. *Zanieczyszczenie srodowiska produktami naftowymi I innymi antropogennymi zanieczyszczeniami organicznymi, ich analityka, monitoring i usuwanie*. Ustronie Morskie, May 18-21.05.2005. С.41-48.

23.Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов для мікробного синтезу поверхнево активних речовин. *II Міжнародна конференція “Молодь та поступ біології”*. Зб. тез доп. Львів, ЛНУ ім. І.Франка. 2006 р. С.291.

24.Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Новіков В.П. Розробка методу виділення біоПАР з культуральної рідини *Pseudomonas species PS-17*. *III Всеук. Наук.-практ. конференція „Біотехнологія. Освіта. Наука”*. Зб. тез доп. Харків: НУ „ХПІ”. 2006 р. с.111.

25. Pashynska V., Glamazda A., Plokhotnichenko A., Karpenko E., Pokynbroda T., Karachevtsev V. Spectroscopic investigations of carbon nanotubes in aqueous suspensions with biosurfactants. *XXIX th European Congress on Molecular Spectroscopy EUCMOS 2008*. August 31-September 5. 2008. Opatija, Croatia. Book of Abstracts. P.171.

26.Пристай М.В., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Макітра Р.Г. Оцінка екстракційної здатності розчинників при виділенні біологічних

поверхнево-активних речовин. *Тези доп IV міжнародної науково-практичної конференції „Біотехнологія. Наука Освіта. практика”*. 11-13 листопада 2008 р. Дніпропетровськ: УДХТУ. 2008. С.51-52.

27.Макітра Р.Г., Карпенко О.В., Покинсьброда Т.Я., Роговик В.І., Пальчикова О.Я., Роговик Н.В. Прогнозування розподілу біологічно активних речовин між органічною та водною фазами. *Тези доп. нац. наук.-прак. конференції з міжнар. участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно активних сполук та фарм. препаратів»*, Львів, 15-18 жовтня. 2008. Вид. «Львівська політехніка». С.161.

28.Покинсьброда Т., Пристай М., Єрохін В., Карпенко О. Зміна проникності клітинних мембран під впливом біогенних поверхнево-активних речовин. *V міжнар. конф. “Молодь та поступ біології”*. Зб. тез доп. Львів, ЛНУ ім. І.Франка. 2009 р. Т.2. С.197.

29.Карпенко І.В., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Баранов В.І. Стимулювання росту рослин мікроорганізмами роду *Pseudomonas*. *Матеріали наук. конференції "Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного парку"*. Шацьк. 10–13 вересня 2015 р. С.37-38.

30.Pokynbroda T.Y., I.V. Karpenko, V.P. Novikov, V.I. Baranov, O.V. Karpenko. The biosynthesis products of the bacteria of genus *Pseudomonas* for plant cultivation. *International Scientific Congress «Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology»*. 29 September – 2 October 2015. Lviv. Ukraine. P. 80.

31.Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В. Синтез біосурфактантів штамами *Pseudomonas* на відходах виробництва біодизелю. *Матеріали міжнар. наук.-прак. інтернет-конф. «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації»*. 14-15 грудня 2016 р. С.155-160.

32. Зінь Я.І., Хлопик О.П., Покинсьброда Т.Я. Вплив розмірів катодних включень на корозію модельних зразків алюмінієвого сплаву. *Матеріали відкритої науково-технічної конференції молодих науковців і спеціалістів ФМІ ім. Г.В. Карпенка НАН України КМН-2017*. Львів-2017. С. 70-75.

33. Зінь І.М., Тимусь М.Б., Хлопик О.П., Покинсьброда Т.Я. Інгібування корозії дюралюмінієвого сплаву (Д16Т) рамноліпідним біокомплексом (РБК) та супернатантом культуральної рідини (СКР) у корозивних середовищах. *Матеріали XIII міжнар. наук.-тех. конференції "ABIA-2017"*. 19-21 квітня. Київ 2017. С. 27-99.

34. Наконечна А.В., Баня А.Р., Карпенко А.Я., Хомяк С.В., Покинсьброда Т.Я., Швець В.В., Новиков В.П., Лубенець В.И. Использование тиосульфатов в комплексной фиторемедиации загрязненной нефтью почвы. *Материалы XIII междунар. науч.-практ. конф. «Технологические аспекты современного аграрного производства и охраны окружающей среды»*. 8-11 ноября 2017. Алматы, Казахстан. С. 47-48.

35. Семенюк И.В., Баня А.Р., Покинсьброда Т.Я., Мидяна Г.Г., Карпенко Е.В. Влияние гуминовых композиций на ростовые показатели пшеницы озимой. *Материалы XIII междунар. науч.-практ. конф. «Технологические аспекты современного аграрного производства и охраны окружающей среды»*. 8-11 ноября 2017, Алматы, Казахстан. С. 73-75.

36. Karpenko E., Lisova N., Scheglova N., Vildanova R., Pokynbroda T., Hamkalo Z. The perspectives of using ecologically safe surfactants for agriculture. *In: Development in production and use of new agrochemicals. Chemistry for Agriculture*. Edited by H.Gorecki, Zb. Dobrzanski, P. Kafarski. Chem-Pol Trade. 2005. Vol.6. P. 786–793.

37. Карпенко Е. В., Покинсьброда Т.Я., Макитра Р.Г., Пальчикова Е.Я. Оптимальные методы выделения биогенных поверхностно-активных рамнолипидов. *Журнал общей химии*. 2009. Т. 12. С. 2011-2014.

38. Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Ващенко Л. М., Покинсьброда Т. Я., Карпенко О. В. Синтез сурфактантів штамами *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Мікробіологічний журнал*. 2009. Т. 71. №3. С. 10 – 14.

## ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Загальна характеристика ПАР	27
1.2. Поверхнево-активні сполуки бактерій роду <i>Pseudomonas</i>	28
1.3 Вибір економічно вигідних джерел вуглецю	31
1.4 Оптимізація умов синтезу біоПАР	33
1.5 Виділення та очищення цільових продуктів	35
1.6 Властивості біоПАР	36
1.7 Галузі застосування ПАР	41
Висновки до розділу 1	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1. Об'єкти досліджень	50
2.2. Мікробіологічні методи	50
2.3 Методи виділення продуктів	53
2.4. Аналітичні методи	55
2.5. Фізико-хімічні методи	57
2.6. Математичні методи	60
2.7. Біологічні методи	62
2.8. Методи визначення корозійної стійкості	66
2.9. Синтез наночастинок	67
2.10. Статистичний аналіз	67
РОЗДІЛ 3 СИНТЕЗ ПАР ШТАМАМИ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i>	
3.1. Скринінг бактерій роду <i>Pseudomonas</i> як продуцентів ПАР	68
3.2. Використання економічно вигідних субстратів для синтезу ПАР штамами <i>Pseudomonas</i>	70
3.3. Оптимізація поживних середовищ та підбір джерел вуглецю для культивування штаму <i>Pseudomonas</i> sp PS-17	76

3.3.1. Розробка оптимального складу ферментаційного та інокуляційного середовищ для синтезу біоПАР	76
3.3.2 Використання змішаних субстратів	80
3.4. Розроблення та удосконалення способів виділення поверхнево-активних продуктів	86
3.4.1. Використання методу багатопараметрових рівнянь для екстракції ПАР штамів <i>Pseudomonas</i>	86
3.4.2. Виділення ПАР із супернатанту культуральної рідини штаму <i>P. aureofaciens</i> NB-1	94
3.4.3. Виділення поверхнево-активних комплексів штамів <i>Pseudomonas</i>	98
3.4.4. Виділення полігідроксиалкоаноатів з біомаси штамів роду <i>Pseudomonas</i>	99
Висновки до розділу 3	100
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ПАР ШТАМУ <i>P. FLUORESCENS</i> 8573	
4.1. Принципова технологічна й апаратурно-технологічна схеми процесу отримання продуктів <i>P. fluorescens</i> 8573	103
4.2. Опис технологічного процесу одержання продуктів <i>P. fluorescens</i> 8573	107
4.3 Матеріальний баланс процесу ферментації	115
4.4 Розрахунок економічної ефективності технології отримання ПАР <i>P. fluorescens</i> 8573	118
4.5. SWOT-аналіз та порівняльні характеристики рамноліпідних ПАР та їх аналогів	122
Висновки до розділу 4	124
РОЗДІЛ 5. ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ ШТАМІВ <i>PSEUDOMONAS</i>	
5.1. Емульгувальні і поверхнево-активні властивості продуктів штамів <i>Pseudomonas</i>	125

5.2. Колоїдні характеристики водних систем рамноліпідного біокомплексу штаму <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17 з Твін-80	136
5.3. Біологічні властивості рамноліпідних ПАР штамів <i>Pseudomonas</i>	140
Висновки до розділу 5	146
РОЗДІЛ 6 ЗАСТОСУВАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ ШТАМІВ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i>	
6.1. Антимікробні засоби з використанням ПАР штамів роду <i>Pseudomonas</i>	147
6.2. Використання штамів роду <i>Pseudomonas</i> при вирощуванні рослин	149
6.3. Синтез наночастинок срібла із використанням рамноліпідних ПАР штамів <i>Pseudomonas</i>	159
6.4. ПАР штамів роду <i>Pseudomonas</i> як інгібітори корозії металів	161
6.5. ПАР штамів роду <i>Pseudomonas</i> для очищення ґрунтів і води від вуглеводневих забруднень	164
Висновки до розділу 6	171
ВИСНОВКИ	173
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	175
ДОДАТОК А. СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	196
ДОДАТОК Б. АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ	202

## СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

біоПАР – біогенні поверхнево-активні речовини

БП – бензпірен

ГЛБ – гідрофільно-ліпофільний баланс

ДДС – натрій додецилсульфат

ДП – дизельне пальне

ЕА – емульгувальна активність

ЗМП – змішана мікробна популяція

ККМ – критична концентрація міцелоутворення

СКР – супернатант культуральної рідини

ЛП – пептидоліпіди

ЛПС – ліпополісахарид

МКС – масовий коефіцієнт солюбілізації

МПА – м'ясо-пептонний агар

НПАР – неіонні поверхнево-активні речовини

ПАВ – поліциклічні ароматичні вуглеводні

ПМ – посівний матеріал

ПС – поживне середовище

ПГА – полігідроксиалкоаноати

РЕ – рамнозний еквівалент

РЛ – рамноліпіди

ТС – технологічна схема

ТШХ – тонкошарова хроматографія

CMD – Critical Micelle Delution – розведення супернатанту до ККМ

E<sub>24</sub> – індекс емульгування

$\sigma$  –поверхневий натяг



## ВСТУП

**Актуальність теми.** На сьогоднішній день поверхнево-активні речовини (ПАР) широко використовуються в промисловості, сільському господарстві, медицині. Однак це, в основному, синтетичні ПАР, які, незважаючи на їх унікальні властивості, є токсичними, важко деградують у природних умовах, отже, є небезпечними для довкілля. Альтернативою їм можуть бути продукти мікробного синтезу (біоПАР, біосурфактанти), перевагами яких є висока ефективність, стійкість у широкому діапазоні температури та рН, біологічна активність (вплив на метаболізм мікроорганізмів, проникність клітинних мембран, активність ферментів тощо), а водночас біодеградабельність і низька токсичність [1]. При створенні технологій біоПАР актуальною проблемою є пошук активних штамів-продуцентів, здатних синтезувати поверхнево-активні речовини на недорогій сировині, та оптимізація їх виробництва. Серед перспективних мікроорганізмів заслуговують уваги представники роду *Pseudomonas*, які синтезують позаклітинні рамноліпіди з високою поверхневою, емульгувальною і піноутворювальною активністю [2]. Проте, через високу вартість виробництва біогенні ПАР поки не витримують конкуренції з синтетичними, їх економічна доступність лімітується не лише вартістю біосинтезу, а й витратами на виділення та очищення цільових продуктів. Крім того, незважаючи на підвищений практичний інтерес до ПАР мікробного походження, все ще недостатньо охарактеризовані їх фізико-хімічні та біологічні властивості, що необхідні для оцінки практичного потенціалу у конкретних галузях. Так, показники емульгування, піноутворення, міцелоутворення є важливими для трактування ролі біоПАР у мийних засобах, модифікації поверхонь, регулювання транспорту біологічно активних речовин, процесів витиснення нафти тощо [3]. Отже, розроблення раціональних технологій рамноліпідних ПАР та визначення функціональних властивостей дозволить створити нові альтернативні

продукти – ефективні й екологічно безпечні, які зможуть успішно замінити синтетичні ПАР у сучасних технологіях.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана у відділі хімії і біотехнології горючих копалин Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М.Литвиненка НАН України в рамках наступних науково-дослідних робіт: “Фізико-хімічні основи мікробного синтезу нових біогенних поверхнево-активних речовин” (2002-2006 рр., державний реєстраційний № 0102U001755); “Створення нових екологічно безпечних матеріалів на основі каротиноїдів, полісахаридів та ПАР” (2007-2011 рр., державний реєстраційний № 0107U001276), «Фізико-хімічні основи створення високоефективних поверхнево-активних систем на основі біогенних ліпідів, біополімерів та їх комплексів» (2011-2015 рр. державний реєстраційний № 0110U005055); «Фізико-хімічні основи використання біогенних поверхнево-активних речовин у косметичі та фармакології» (2016–2018 рр., державний реєстраційний №0116U003380); «Розроблення технології біогенних поверхнево-активних речовин та композиційних біоцидних препаратів для рослинництва» (2016-2017 рр., державний реєстраційний № 0116U008879), “Розробка біогенних інгібіторів для захисту від корозії та біокорозії нафтогазовидобувного обладнання» (2016-2018 рр., державний реєстраційний № 0117U001347), проектів № 3200 «Розробка нових поверхнево-активних поліфункціональних регуляторів для сільського господарства та очистки довкілля», № 3494 «Биоремедиация почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами», № 5965 «Створення нових інгібіторів корозії металів для нафтогазової промисловості із застосуванням екологічно безпечних поверхнево-активних речовин: оптимізація біосинтезу ПАР та дослідження їх властивостей». Дисертантка брала участь у виконанні наведених робіт як виконавець.

**Метою роботи** є розроблення біотехнології отримання поверхнево-активних речовин штамів *Pseudomonas* шляхом оптимізації умов

культивування та виділення цільових продуктів, дослідження їх основних фізико-хімічних і біологічних властивостей та практичного потенціалу.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **задачі**:

- провести скринінг штамів *Pseudomonas* за здатністю до синтезу ПАР;
- вивчити процеси синтезу біоПАР обраними штамами *Pseudomonas* з використанням різних субстратів, зокрема економічно вигідних та сумішей;
- визначити раціональні умови синтезу ПАР штамів *Pseudomonas*, способи їх виділення, визначити склад продуктів;
- розробити технологічну схему одержання рамноліпідних ПАР – продуктів синтезу перспективного штаму-продуценту роду *Pseudomonas*;
- дослідити фізико-хімічні і біологічні властивості біоПАР штамів *Pseudomonas*;
- визначити особливості застосування поверхнево-активних продуктів штамів *Pseudomonas* у промисловості та сільському господарстві.

Об'єкт дослідження – біотехнології мікробного синтезу поверхнево-активних речовин.

Предмет дослідження – біотехнологічні параметри одержання поверхнево-активних продуктів штамів роду *Pseudomonas*, їх функціональні властивості, застосування у промисловості, сільському господарстві, охороні довкілля.

**Методи досліджень.** В експериментах використано мікробіологічні (культивування й аналіз мікроорганізмів), біотехнологічні (мікробний синтез ПАР), хімічні (аналіз вмісту рамноліпідів, полісахаридів, вуглеводнів тощо), фізико-хімічні (визначення поверхневої, емульгувальної активності, показників критичної концентрації міцелоутворення (ККМ), солюбілізації, піноутворення, змочування), спектральні, біохімічні (проникність клітинних мембран), математичні методи (математичне моделювання для оптимізації мікробного синтезу та екстракції, статистична обробка результатів) та хемоінформатики (PASS).

**Наукова новизна одержаних результатів.** При виконанні досліджень вперше одержані наступні результати. Відібрано нові перспективні штами *P. fluorescens* 8573 і *P. aureofaciens* NB-1 - продуценти рамноліпідних і ліпопептидних ПАР. Розроблено раціональні шляхи підвищення ефективності синтезу ПАР штамів *Pseudomonas*, зокрема із застосуванням змішаних джерел вуглецю, що дозволило збільшити вихід продуктів в 1,8 разів та скоротити тривалість культивування до 4 діб. Оптимізовано способи виділення та екстракції ПАР, зокрема за допомогою багатопараметрових рівнянь. Вперше встановлено, що надосадова рідина (НОР), яка є побічним продуктом після виділення біокомплексів, володіє поверхневими, емульгувальними, змочувальними властивостями. Встановлено здатність ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 активувати біорозкладання токсичного важкодеградабельного забруднювача бензпірену, а ПАР штамів *P. fluorescens* 8573 і *P. aureofaciens* NB-1 – інгібувати корозію металів і стимулювати ріст сільськогосподарських рослин. Вперше показано ефективність рамноліпідних ПАР для синтезу наночастинок срібла.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено біотехнології одержання поверхнево-активних речовин штамів *Pseudomonas*, у тому числі на економічно вигідних (дешеві рослинні олії, відходи виробництва біодизелю) та змішаних субстратах. Розроблено апаратурно-технологічну схему безвідходного виробництва біоПАР штаму на прикладі *P. fluorescens* 8573, застосування якої дозволило отримати 5 цільових поверхнево-активних продуктів та максимально використати побічні продукти постферментаційної культуральної рідини (біомасу, НОР). Встановлено доцільність використання ПАР штамів *Pseudomonas* як екологічно безпечних інгібіторів корозії металів, регуляторів росту та укорінення рослин, що підтверджено експериментами у польових умовах. Практичне значення результатів засвідчено відповідними актами

впровадження та патентами України: UA № 71792 A 15.12.2004, UA № 36704, 10.11.2008.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом проведено критичний аналіз літератури, теоретичні й експериментальні дослідження з розробки технологій синтезу рамноліпідних ПАР та шляхів їх практичного застосування. Планування експериментів, аналіз результатів, роботи з практичного застосування біоПАР проводили спільно з науковим керівником д.т.н. Карпенко О.В., оптимізацію синтезу ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 – з Єрохіним В. А., оптимізацію екстракції методом багатопараметрових рівнянь – спільно з проф. Макітрою Р.Г., токсичність ПАР на ракоподібних – спільно з к.б.н. Шульгою О.М., гідрофільно-ліпофільний баланс і солюбілізацію – з проф. Менджицькою К. (Технічний університет Гданськ, Польща), вплив біоПАР на деструкцію бензпірену – спільно з Малаховською А. (Технічний університет, Глівіце, Польща), скринінг штамів *Pseudomonas* – з проф. Гвоздяком Р.І. (ІМВ ім. Д.К.Заболотного), інгібування корозії металів – з д.т.н. Зінем І.М., синтез наночастинок срібла – з к.х.н. Кицею А.Р., які є співавторами статей.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати роботи представлені на конференціях: міжнародній конференції «Bioremediation of soil and groundwater», Cracow, Poland, 2004; міжнародній конференції «Statistical Physics 2005: Modern problems and new applications», Lviv, 2005; міжнародній конференції «Zanieczyszczenie srodowiska produktami naftowymi i innymi antropogennymi zanieczyszczeniami organicznymi, ich analityka, monitoring i usuwanie», Ustronie, Poland, 2005, II, V Міжнародних конференціях «Молодь та поступ біології», ЛНУ ім. І.Франка, 2006, 2009 рр; II, III, IV Науково-практичних конференціях „Біотехнологія. Освіта. Наука”, 24th European Congress on Molecular Spectroscopy EUCMOS 2008, Оратіја, Croatia, Науково-практичній конференції «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно активних сполук та фармпрепаратів», Львів, 2008, "Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного парку",

Шацьк, 2015; International Scientific Congress «Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology» 2015; Міжнародних науково-практичних конференціях «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації».2016р; Lviv, Ukraine та “ABIA-2017”, Київ, 2017; XIII міжнародній конференції *daRostim-2017* «Технологические аспекты современного аграрного производства и охраны окружающей среды», Алматы, Казахстан; конференції молодих науковців КМН-2017, ФМІ ім. Г.В. Карпенка НАН України, Львів.

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 38 наукових праць, у тому числі 12 статей у наукових фахових виданнях, з них 2 статті у виданнях іноземних держав, 2 статті у вітчизняних журналах, які представлено у наукометричних базах, 2 патенти України, 21 теза доповідей на конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та обговорення результатів, висновків, списку використаних джерел (226 найменувань), 2 додатки. Робота представлена на 207 сторінках друкованого тексту, містить 27 рисунків і 33 таблиці.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Загальна характеристика мікробних ПАР

Поверхнево-активні речовини (сурфактанти) – це амфіфільні молекули, які мають гідрофільну і гідрофобну частину (переважно вуглеводневу), що розділяються на поверхні розділу між фазами з різним рівнем полярності і водневими зв'язками, такими як нафта/вода, повітря/вода. Це дозволяє сурфактантам знижувати поверхневий і міжфазний натяг та формувати мікроемульсію, де вуглеводні розчиняються у воді або вода розчиняється у вуглеводнях. Саме тому їм притаманні миючі, емульгуючі, піноутворюючі та диспергуючі властивостями і вони є натеper найзастосовуванішими хімічними речовинами. Поверхнево-активні речовини використовуються у таких галузях народного господарства як нафтовидобуток, нафтопереробка, металургія, машинобудування, бурова техніка та геологія, сільське господарство, хімічна, текстильна, шкіряна, парфюмерно-косметична, фармацевтична, харчова промисловості. Проте, незважаючи на унікальні фізико-хімічні властивості, хімічні ПАР, що традиційно використовують у народному господарстві, забруднюють навколишнє середовище. Тому в останні роки все більшої актуальності набуває дослідження і використання біогенних ПАР (біосурфактантів).

Біосурфактанти – це структурно різноманітна група поверхнево активних речовин, що синтезуються мікроорганізмами. Вони біодеградабельні та зменшують поверхневий і міжфазний натяг у водних розчинах і вуглеводнях, що дозволяє застосовувати їх для деструкції нафтових та інших органічних забруднень [1]. На відміну від хімічно синтезованих сурфактантів, що класифікуються за природою їх полярної групи, біосурфактанти класифікують переважно за хімічним складом і мікробним походженням [2]. В загальному їх структура включає гідрофільну частину, що представлена амінокислотами, білковими аніонами чи катіонами, моно-, ди- або полісахаридами та гідрофобну частину, яка

включає ненасичені чи насичені жирні кислоти. Відповідно, основними класами біосурфактантів є гліколіпіди, ліпопептиди, ліпопротеїди, фосфоліпіди, ЖК, полімерні і низькомолекулярні сурфактанти [1].

Продуцентами гліколіпідів є бактерії родів *Pseudomonas* (рамноліпіди), *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter* (трегалозоліпіди), дріжджі *Torulopsis*, *Candida* (софорозоліпіди), гриби *Ustilago* (целобіозоліпіди). Більшість ліпопептидів синтезується стрептоміцетами (амфоміцин, ендуроміцин, глобоміцин) і деякі виділені з грибів та ціанобактерій [3, 4, 5]. Також ліпопептиди та ліпопротеїди синтезуються *Bacillus licheniformis* (пептидоліпіди), *Pseudomonas fluorescens* (віскозин), *Bacillus subtilis* (сурфактин). До наступного класу поверхнево-активних речовин відносяться фосфоліпіди, що синтезуються мікроорганізмами родів *Thiobacillus thiooxidans*, *Corynebacterium alcanolyticus*, *Corynebacterium lepus*, *Acinetobacter species*, *Candida tropicalis*, *Micrococcus cerificans* та іншими [6]. Жирні кислоти і нейтральні ліпіди виявлені в усіх мікроорганізмів – позаклітинні поверхнево-активні жирні кислоти синтезуються бактеріями родів *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Penicilium*, *Aspergillus*, *Acinetobacter*, *Candida*, *Rhodococcus* та ін. [6, 7]. Деякі мікроорганізми при рості на вуглеводневих субстратах здатні синтезувати полісахарид-ліпідні комплекси, як наприклад штами *Candida tropicalis* і *Pseudomonas aeruginosa* [7, 8]. Отже, мікроорганізми синтезують широкий спектр поверхнево-активних сполук, які відрізняються хімічною структурою, фізико-хімічними властивостями і біологічною активністю.

## 1.2. Поверхнево-активні сполуки бактерій роду *Pseudomonas*

Основними продуцентами гліколіпідів є бактерії роду *Pseudomonas*. Це, переважно, рамноліпіди [9, 10, 11, 12], але зустрічаються й дані про ліпопептиди [12, 13]. Штами *P. fluorescens* синтезують широкий спектр сурфактантів – глікопротеїни, ліпопептиди, гліколіпіди [11, 13, 14].



Виділений з індустріальних стічних вод штам *P. fluorescens* HW-6 синтезував гліколіпідні сурфактанти в кількості 1,4-2,0 г/дм<sup>3</sup>, при використанні гексадекану як єдиного джерела вуглецю. Цей сурфактант знижував поверхневий натяг до 35 мН/м та мав ККМ 20 мг/ дм<sup>3</sup>, ефективно емульгував ароматичні вуглеводні, гас, парафіни, мінеральні оливи. Синтезом циклічних ліпопептидів (візкозинамід, тензин, амфізин) із протигрибковими та поверхнево-активними властивостями характеризується штам *P. fluorescens* ризосфери цукрового буряка [15].

Рамноліпіди синтезуються бактеріями роду *Pseudomonas* в кінці логарифмічної та в стаціонарній фазі росту [16]. Вперше рамноліпіди були виявлені в супернатанті культуральної рідини *Pseudomonas putrescens* Bergström в 1946 році, а в кристалічному виді виділені Yarvis F.G Johnson M.Y. в 1949 році. Натепер виявлено 28 гомологів рамноліпідів (РЛ) [17], серед яких найчастіше зустрічаються РЛ1, РЛ2, РЛ3 та РЛ4 (рис.1.1). Ці рамноліпіди відрізняються кількістю молекул сахаридів (рамнози) та довжиною ланцюгів жирних кислот. Найчастіше зустрічаються такі, що містять одну або дві рамнози та жирні кислоти з ланцюгами (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) [18].

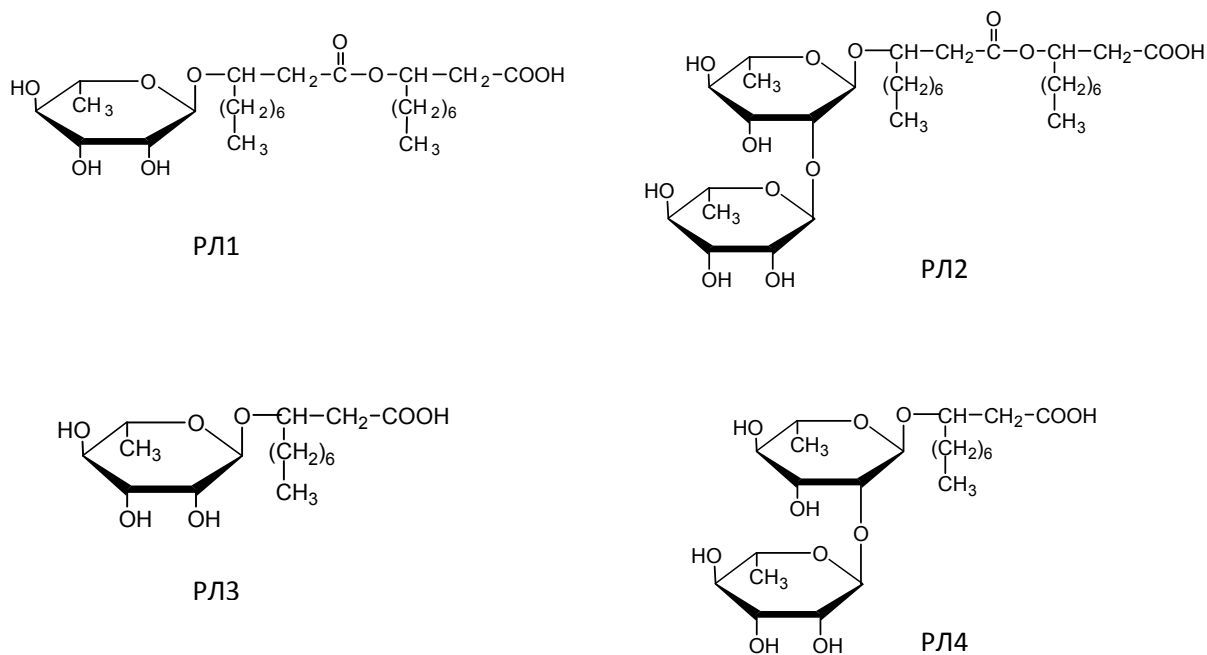
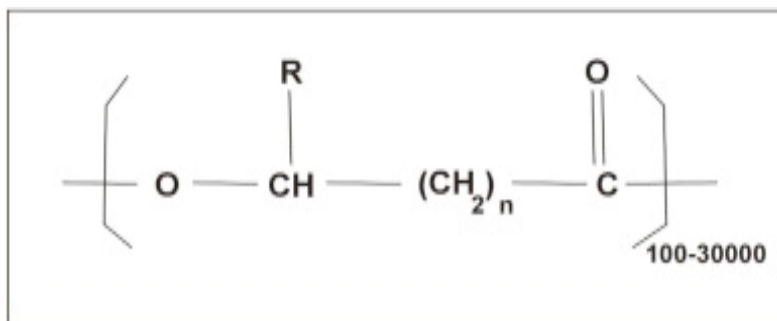


Рис. 1.1– Структурні формули найбільш поширених рамноліпідів [24].

Окрім бактерій *P.aeruginosa*, рамноліпіди здатні синтезувати й інші штами мікроорганізмів, зокрема *B. plantari* [19] та *B.pseudomallei* [20] чи *R.salmoninarum* [21]. Є дані, що такі ПАР продукує *P. chlororaphis* [22,23].

Також важливими поверхнево-активними речовинами, що синтезуються штамами *Pseudomonas* є полі-β-гідроксіалканові кислоти. Вони, як і рамноліпіди, містять β-гідроксіалканові кислоти в якості основних компонентів. Полігідроксиалканоати (ПГА) – це біополімери, локалізовані у клітинах у вигляді ліпідних включень, які мікроорганізми синтезують для зберігання енергії [25] та зберігають у цитоплазмі у вигляді гранул розміром від 0,2 до 0,5 мкм. Це складні поліефіри 3-, 4-, 5- та 6-гідроксиалкенових кислот, що є термопластами, які вперше виявлені Лемоїном у *Bacillus megaterium* в формі полі-3-гідроксибутирату у 1925 р. [26]. Натепер відомо більше 90 родів грампозитивних і грамнегативних бактерій, що продукують ПГА як в аеробних, так і в анаеробних умовах [27, 28]. Загальна структура ПГА показана на рис. 1.2.



**Рис 1.2. Загальна структура полігідроксиалканоатів [29].**

В залежності від хімічного складу, гомо- або співполімерів, ПГА відрізняються властивостями, проте вони нерозчинні в воді, стійкі до гідролітичного впливу та УФ-випромінювання. Крім того, вони є біосумісними і біодеградабельними (наприклад, у ґрунтах) та мають деякі властивості п'єзоелектричних матеріалів [30]. ПГА розчинні у хлороформі й інших хлорвмісних розчинниках. Температура їх склування змінюється від -50 до 4 °С, температура плавлення – від 40 до 180 °С [31]. ПГА можуть замінити нафтохімічні пластмаси через їх здатність до біодеградації, вони є

«зеленими» матеріалами для використання в медицині. Проте, високі витрати на виробництво в порівнянні з традиційними нафтовими пластиками залишаються серйозною перешкодою для поширення ПГА.

За ефективністю біоПАР переважають синтетичні, проте витрати на виробництво визначають їх низьку конкурентоспроможність [32].

### 1.3. Вибір економічно вигідних джерел вуглецю

При створенні технологій біоПАР актуальною проблемою є пошук активних штамів-продуцентів й оптимізація їх біосинтезу. Тип джерела вуглецю для мікробного синтезу ПАР та його кількість може значно впливати на собівартість продукції: вартість сировини переважно складає 10-30% від загальної вартості виробництва. Щоб зменшити ці витрати бажано використовувати недорогі субстрати, одним з рішень є використання субстратів з відновлюваних джерел. Економічно вигідна сировина включає дешеві рослинні олії, відходи нафтової промисловості, молочнокислого, спиртового виробництв, агропромислового комплексу.

Так, серед рослинних олій заслуговують на увагу кокосова і кукурудзяна [33], достатньо дешеві соняшникова, ріпакова та соєва олії [34,35]. Використовують й різні відпрацьовані олії (відходи смаження тощо), а також відходи рафінування олій [36]. При культивуванні штамів роду *Pseudomonas* (*P. ceracia*, *P. acidovorans*, *P. picketti* і *P. fluorescens*) на різних недорогих субстратах найкращий результат був отриманий для *P. ceracia* на середовищі з 2 % рідкого кукурудзяного екстракту і 2 % соєвої олії (відходи смаження) [37]. Поверхневий натяг культуральної рідини був 27,57 мН/м, отримано 5,2 г/л біоПАР. Випробування в екстремальних умовах (рН, температура і вміст NaCl) показало стабільність одержаних ПАР, що важливо для застосування в очищенні нафтозабруднених середовищ: ступінь видалення моторного масла з глинистого ґрунту

становив понад 80 %, експерименти з відмивання каменів від моторної оливи також показали ефект більше 80 %.

Відомо також про використання патоки, кукурудзяного екстракту, відходів молочної промисловості та сирної сироватки (відходи виробництва сиру) як джерел вуглецю й азоту для виробництва рамноліпідних ПАР *P.aeruginosa* [38]. Показано доцільність використання побічних продуктів олійної промисловості, а саме, рослинної олії, промислових залишків, дезодорованого дистиляту, соапстоку тощо [39]. У літературі зустрічаються повідомлення про використання різних дешевих субстратів для біосинтезу рамноліпідів, наприклад, відходів переробки оливкової олії, відходів соняшникової олії [40], соапстоку, жирних кислот [41] тощо. Також, повідомлялося про одержання рамноліпідів при культивуванні *P. aeruginosa* на відходах цукрових [42], молочних та лікєро-горілочаних виробництв [43]. Різноманітні відпрацьовані олії з харчової промисловості та інша агропромислова сировина теж можуть використовуватися як альтернативні й дешеві субстрати [40]. В останні роки у зв'язку із зростанням вартості нафтопродуктів і погіршенням екологічної ситуації різко зростає інтерес до альтернативних джерел палива з рослинної сировини, таких як біодизельне паливо. Побічними продуктами виробництва є технічний гліцерин в вигляді 70-80 % водного розчину, залишків олії і вільних жирних кислот. Проблема утилізації гліцеринвмісних відходів стає ключовою у процесі виробництва біодизельного палива: на кожен тону біодизелю накопичується 100 кг технічного гліцерину. Натепер ведуться інтенсивні пошуки можливостей переробки технічного гліцерину у продукти з високою вартістю. Такий субстрат є цікавим, оскільки він є гідрофільним, а також дешевим та екологічно чистим [44,45]. Є дані, що при використанні технічного гліцерину як джерела вуглецю для біосинтезу рамноліпідів *P. aeruginosa* РАО-1 у ферментері не помічено суттєвої різниці у кількості і складі ПАР у порівнянні з культивуванням на гліцерині [46]. Штам *Bacillus subtilis* ATCC 6633 при рості на відходах біодизелю синтезував 158,14 мг/дм<sup>3</sup> сурфактину

та ефективно емульгував соєву олію та гексадекан [47]. Також викликає інтерес використання суміші субстратів, так показано ефективність пальмової олії з глюкозою (40:1) при синтезі ПАР штамом *P. aeruginosa* SP4 [48]. Отже, використання недорогої сировини, зокрема різноманітних відходів промисловості і сільського господарства мають значний потенціал для культивування мікроорганізмів-продуцентів та синтезу ними біосурфактантів. Сировинні матеріали нижчого ступеня очищення обходяться дешевше та добре засвоюються мікроорганізмами.

#### 1.4. Оптимізація умов синтезу біоПАР

Вихід біоПАР багато в чому залежить від продуктивності штаму, складу середовища і умов ферментації [49]. У даний час багато із запропонованих методів спрямовані на оптимізацію компонентів в середовищі росту з використанням математичних методів, таких як методологія поверхні відповіді [50], математичне моделювання [51] та ін.

Співвідношення компонентів у поживному середовищі суттєво впливає на синтез біоПАР та кількість і якість продукту. За літературними даними, для виробництва рамноліпідів найкращим джерелом азоту є нітрати [52,53]. Повідомляється про успішне використання й інших джерел азоту. Також, оптимальні значення поверхневого натягу (29,9 мН/м) та індексу емульгування ( $E_{24}=73,45\%$ ) досягнуті за додавання у ПС дріжджового екстракту (1,5-2 %) та сечовини (0,1 %) як джерел вуглецю та азоту [54]. Одержані ПАР емульгували ксилол і гас та були стабільними за широкого діапазону температур (25-80° С) та рН (1-9), і вмісту солей (1-5%).

Окрім регулювання біосинтезу ПАР зміною вмісту компонентів ПС, велика увага приділяється умовам культивування продуцентів: підбору значень рН, температурному режиму, швидкості та амплітуді перемішування, тривалості процесів та ін. Більшого виходу продукту можна досягти за рахунок отримання мікробних ПАР на ферментаційному

обладнанні, проте все ще недостатньо даних про їх синтез навіть у лабораторних біореакторах. У перших спробах культивування продуцентів рамноліпідів у ферментерах було одержано 8,5 г/дм<sup>3</sup> [55] та 12,8 г/дм<sup>3</sup> продукту [56], що перевершувало їх вихід у колбах [57]. Таку інтенсифікацію можна пояснити збільшенням переносу кисню у середовищі, зокрема біосинтез на водонерозчинних субстратах потребує більшої аерації, оскільки це енергетично залежний процес [58]. Натепер максимальним виходом рамноліпідів є 112 г/дм<sup>3</sup>, що досягнуто за культивуванні штаму *P. aeruginosa* у ферментері з використанням соєвої олії в якості джерела вуглецю та з лімітом азоту при 30 °C, pH 6,3 [59].

Визначено зв'язок між синтезом рамноліпідів та ПГА *P. aeruginosa* (ATCC 10145) на н-гексадекані: ПГА продукуються тільки при активному рості клітин, тоді як синтез рамноліпідів відбувається на початку стаціонарної фази. Специфічна швидкість синтезу  $\beta$ -гідроксіалканових кислот оцінювалася як 12,6 мг/г сухих клітин) з утворенням ПГА під час фази експоненціального росту [60]. Можливість одночасного синтезу полігідроксіалканоатів і рамноліпідів як нового підходу для зниження витрат на виробництво була продемонстрована культивуванням *P. aeruginosa* IFO3924 [61]. З бактеріальних клітин і супернатанту культуральної рідини отримували ПГА і рамноліпідів відповідно. Для одночасного синтезу цих продуктів деканоат був кращим джерелом вуглецю, ніж етанол і глюкоза, проте, на глюкозі відбувався ріст клітин без індукційного періоду з контролем pH. Вміст ПГА в клітині досягав максимуму, коли джерело вуглецю було вичерпане, після чого кількість ПГА швидко знижувалась, а синтез рамноліпідів продовжувався. Також вивчено вплив співвідношення вуглець / азот (C/N) на ріст і накопичення ПГА [62-64]. Як правило, збільшення C/N сприяє накопиченню ПГА, в той час як для росту клітин спостерігається зворотний ефект.

### 1.5. Виділення та очищення цільових продуктів

Процеси переробки в багатьох біотехнологічних процесах становлять до 50-80% від загальної собівартості виробництва [65] в залежності від складності вилучення продукту, що пов'язана з розчинністю біоПАР у воді та їх локалізацією (внутрішньоклітинна, позаклітинна або клітинно-зв'язана). Оскільки рамноліпіди вилучають з культуральної рідини, що є складною сумішшю та містить неферментований субстрат, солі, амінокислоти, білки та інші метаболічні продукти, подальша очистка рамноліпідів ускладнена, особливо за їх низьких концентрацій [66]. На практиці для виділення ліпідів найчастіше використовують класичні методи екстракції, що дозволяють кількісно вилучити ліпіди практично усіх класів. Найпоширенішими є два методи – екстракція сумішшю Фолча (хлороформ-метанол 2:1) або Блайя і Дайєра (хлороформ-метанол 1:1) [67]. В залежності від хімічної природи ліпідів використовують й модифіковані методи екстракції. Замінивши хлороформ з метанолом на суміш хлороформ – 2%-ний розчин оцтової кислоти у метанолі, можна підвищити вихід полярних ліпідів, також суміш хлороформ-метанол-1М хлоридна кислота (4:2:3) [68].

Вартість цільових продуктів можна знизити, якщо замість очищених рамноліпідів використовувати супернатант культуральної рідини для промислових застосувань, таких як вторинне нафтовидобування та ін. або концентрат ліпідів для використання у технологіях, що не потребують значного очищення продукту, наприклад у сільському господарстві, для поліпшення біодеградації забруднюючих речовин, якості ґрунту, для непрямого стимулювання росту рослин. Для отримання чистих рамноліпідів (наприклад для використання у фармації, ветеринарії чи медицині) потрібні додаткові етапи очищення, які вимагають не тільки часу, а й витрат на експлуатацію та реагенти. Отже, ціна на біосурфактанти лімітується не стільки високою вартістю субстратів для культивування, а й витратами на виділення та очищення продуктів. Тому зростає потреба не тільки в нових

штамах, що здатні синтезувати поверхнево-активні речовини на недорогих ростових субстратах, зокрема з поновлюваної сировини, а також у спрощенні й здешевленні процесів вилучення біосурфактантів.

Навіть при наявності оптимізованих поживних середовищ та умов культивування продуцентів ПАР, без ефективних способів виділення продуктів з постферментаційної культуральної рідини та їх очищення виробництво не буде досконалим [69,70], тому надзвичайно важливим завданням є розроблення раціональних шляхів їх виділення.

### 1.6. Властивості біоПАР

**Фізико-хімічні властивості.** Найважливішими методами оцінки поверхневої активності є визначення поверхневого (ПН), міжфазного натягу, емульгування гідрофобних речовин та гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ). ПН є важливою характеристикою біоПАР і виникає на поверхнях розділу фаз рідина-газ, а міжфазний – на поверхнях розділу двох різних рідин [71, 72], цей показник є первинною оцінкою присутності ПАР в середовищі. Рамноліпіди зменшують ПН води з 72,3 мН/м до приблизно 30 мН/м, а міжфазний натяг водно-олійних систем – з 43 мН / м до 1 мН/м. ПН зменшується зі збільшенням концентрації поверхнево-активної речовини у водному середовищі до критичної концентрації міцелоутворення (ККМ). Вона визначається як концентрація ПАР, при якій у розчині виникає велике число міцел, що перебувають у термодинамічній рівновазі з молекулами (йонами), та різко змінюються його властивості (електропровідність, поверхневий натяг, в'язкість, світлорозсіювання). При концентраціях, вищих ККМ молекули біоПАР асоціюють з утворенням міцел [73,74]. Важливою характеристикою ПАР є їх здатність до емульгування. ПАР як емульгатори стабілізують дисперсну фазу у дисперсному середовищі. Дія емульгаторів багатобічна. Вони відповідають за взаємний розподіл двох фаз, що не змішуються, за консистенцію, пластичні властивості, в'язкість. Рамноліпіди



є універсальними емульгаторами природного походження для різноманітних речовин у широкому діапазоні рН. Також вони проявляють синергічну активність до синтетичних ПАР, а в змішаній поверхнево-активній системі забезпечують зменшення концентрації синтетичного компонента. ПАР можуть утворювати два типи емульсій – вода в олії (ПАР, що більше розчинні в олії) і олія в воді (ПАР, які більше розчинні у воді). Величина гідрофільно-ліпофільного балансу показує, чи буде ПАР сприяти утворенню емульсії вода-в-олії або олія-в-воді, на основі порівнянь із значеннями ГЛБ відомих ПАР (від 1 – для олеїнової кислоти до 20 – для натрій олеата). Емульгатори з ГЛБ менше, ніж 6 сприяють стабілізації емульсій вода-в-олії, а з ГЛБ від 10 до 18 – олія-в-воді [75]. ККМ біосурфактантів коливається в межах від 1 до 2000 мг/л, що набагато нижче за хімічні аналоги, отже біоПАР можна з успіхом використовувати у нижчих концентраціях на заміну синтетичним ПАР [76,77].

Таблиця 1.1.

**Критична концентрація міцелоутворення синтетичних та біосурфактантів [76].**

ПАР	ККМ, мг/дм <sup>3</sup>
Фосфатидилетаноламін	30
Фосфатидна кислота	70
Рамноліпіди	20
Сурфактин	11
Алкілбензолсульфонат	590
Додецилсульфат натрію	2000-2900

Важливою властивістю біоПАР є їх стійкість до температури, рН та концентрації солей, тому їх можна використовувати в екстремальних умовах. Ліпопептид *Bacillus licheniformis* JF-2 стабільний за температури 75° С до 140 годин і в діапазоні рН від 5 до 12 [78]. БіоПАР також активні за концентрації солей – до 10%, тоді як синтетичні ПАР переважно

інактивуються у 2% розчині NaCl [79]. Вибір джерел вуглецю у середовищах для синтезу впливає на склад суміші рамноліпідів, що різняться й фізико-хімічними властивостями. Так, на пересмажених оліях отримали суміш з одинадцяти гомологів РЛ. В суміші, де були присутні 19% ненасичених гідрофобних ланцюгів ПН становив 32,8 мН/м, а ККМ – 108 мг/дм<sup>3</sup>. ККМ суміші, в якій були насичені гідрофобні ланцюги, була вищою, що вказує на можливу кореляцію між ступенем ненасиченості і ККМ [80]. На соапстоках отримали суміш рамноліпідів, що містила 31% ненасичених жирних кислот та мала ККМ 120 мг/л, поверхневий натяг 24 мН/м, а міжфазний - 1,31 мН/м. Суміш РЛ, отриманих на кукурудзяній олії із низьким РЛ<sub>2</sub>C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> мала ККМ 37 мг/л, а ПН – 36 мН/м. Суміш з високим вмістом РЛ<sub>2</sub>C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> - ККМ 53 мг/л і поверхневий натяг 31 мН/м. Наявність довших ланцюгів жирних кислот збільшує гідрофобність молекул, тому агрегація у вигляді міцел відбувається в менших концентраціях [80].

Рамноліпідні ПАР емульгують вуглеводні і, як правило, стабілізують емульсії. У роботі [81] тестували здатність РЛ емульгувати олії, використовувані в таких галузях, як косметична, агрохімічна, біоремедіація. Загалом, емульсії, утворені сумішами рамноліпідів, легко формувалися, і їх стабільність була вища, порівняно з чистими рамноліпідами. У роботі [82] вивчали вплив спиртів на фазову поведінку мікроемульсій. Рамноліпіди показали кращі результати створення мікроемульсій в порівнянні з іншими поверхнево-активними речовинами. Показано стабілізуючий вплив РЛ на водні емульсії н-алканів (C<sub>10</sub> –C<sub>18</sub>), 1-алкенів (C<sub>14</sub> –C<sub>16</sub>), ароматичних речовин, сирої нафти, гасу, кокосової та оливкової олії.

ПАР у водних розчинах адсорбуються на твердих поверхнях та змінюють її адгезійний натяг, що спричиняє часткове або повне змочування поверхні водним розчином ПАР. Це є основою багатьох промислових і біологічних процесів. Змочування рамноліпідів РЛ1, РЛ2 та їх сумішей вивчали шляхом вимірювання контактних кутів змочування твердих поверхонь (скло, поліетилентерефталат (ПЕТ) і поверхня золота) [83]. При

низькій концентрації ПАР для розчинів рамноліпідів і натрій додецилсульфату були отримані аналогічні контактні кути для всіх випробовуваних поверхонь, але змочуюча здатність РЛ росла із збільшенням концентрації. Тобто, у порівнянні з натрій додецилсульфатом, РЛ більш ефективно змочували всіх поверхні. Додавання електроліту в розчин іонних ПАР приводить до зростання поверхневої активності та збільшення міцелутворення. У роботі [84] повідомляють, що присутність NaCl захищає карбоксильні групи молекул РЛ, завдяки чому вони виявляють властивості нейоногенних ПАР.

**Біологічні властивості.** Як відомо, поверхнево-активні речовини (синтетичні та біогенні) завдяки своїй дифільній природі можуть специфічно діяти на клітини мікроорганізмів [1]. У великих концентраціях вони спричиняють загибель клітин, тобто виявляють інгібувальну чи бактерицидну дію, взаємодіючи з клітинною стінкою і порушуючи вибірккову проникність плазматичної мембрани і функції ЛПМ [1]. Вважають, що вплив біосурфактантів на живі клітини безпосередньо пов'язаний зі змінами в біологічних мембранах, зокрема регулюванням проникності клітинних мембран [85]. Здатність біоПАР до зміни мембранної проникності, очевидно, має велике значення для різних біотехнологічних процесів та використання у промисловості, аграрній галузі, медицині. У роботі [86] встановлено вплив рамноліпідів на проникність мембран мікроорганізмів *Pseudomonas*, *Bacillus*, показано, що у кількостях, вищих за ККМ, ці ПАР інгібують ріст грампозитивних бактерій, проте грамнегативні бактерії слабо інгібуються або не інгібуються зовсім [87-90]. Дія різних за хімічною природою ПАР на мікроорганізми теж відрізняється. Наприклад, ефективність нейоногенних ПАР (Бридж-58) в 1000 раз нижча, ніж у аніонних, таких (натрій додецилсульфат, дезоксихолат). Це може бути пояснено тим, що НПАР утворюють у водному середовищі міцели, розмір яких більший, ніж у міцел йоногенних ПАР, і перевищує розмір пор у клітинній стінці дріжджів (54Å). ПАР здатні

проникати у клітину через пори та взаємодіяти з компонентами клітинних стінок: муреїновим шаром, білками, ліпідами, ліпопротеїдами, ліпополісахаридами. Зв'язування ПАР з мембраною залежить від числа зв'язуючих місць та від ступеню їх спорідненості до молекул ПАР. Цим зумовлена м'яка дія НПАР на мембрани, бо значення їх ККМ нижчі, ніж у АПАР [1]. Поліоксиетиленімін (ПОЕА) використовується як ефективний пермеабілізатор грамнегативних бактерій: при концентраціях, менших 20 мкг/мл ПОЕА збільшував поглинання бактеріями 1-N-фенітнафтиламіну. Подібні результати для ЕДТА. Також ПОЕА збільшував чутливість мікроорганізмів до антибіотиків [91]. Проникність клітин досліджували методами електропермеабілізації, з додаванням помірних нейонних ПАР (сапонін, дигітонін), токсинами - альфа-токсин та стрептолізин. [92]. РЛ за концентрацій більше ККМ стимулювали виділення 22% ліпополісахаридів *P. aeruginosa* NBIMCC 1390 та збільшували гідрофобність клітин на 31 %, за концентрацій менше ККМ – не пошкоджували ЛПС [93]. Наявність РЛ стимулювала синтез ЛПС *P. aeruginosa*, підвищувала гідрофобність клітинної стінки [94]. РЛ і Тритон Х-100 мають подібну дію на *Saccharomyces cerevisiae* 83-20, не руйнують внутрішньоклітинну структуру дріжджів [95,96]. Адсорбція РЛ на клітинах *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *Candida lipolytica* проходить шляхом зміни гідрофобності клітин [97,98]. Поглинальна здатність клітин мікроорганізмів до монорамноліпиду значно вища, ніж до дирамноліпиду [99]. Встановлено дію трегалозоліпідних ПАР на фосfolіпиди мікробних мембран. Вони вбудовувались у зв'язки між фосфофрагментами [100]. Мас-спектри показали утворення супрамолекулярних комплексів моно- і дирамноліпідів з модельним мембранним фосfolіпідом (дипальмітоїлфосфатидилхоліном), що може бути ймовірним поясненням дії біоПАР на мембрани на молекулярному рівні, що є підґрунтям їх біологічної активності [100].

Завдяки таким властивостям, а також впливу на мембранозв'язані ферменти біосурфактанти можуть підсилювати дію антибіотиків. Є дані, що

рамноліпіди мають антигрибкову дію щодо фітопатогенів, вони розривають плазматичну мембрану спор [101]. Циклічні ліпопептиди (візкозинамід, тензин, амфізин), синтезовані штамом *P.fluorescens*, ізольованим з ґрунтової ризосфери цукрового буряка, також проявляють протигрибкові властивості [102]. Токсичність сурфактантів тестували на креветках *Artemia* та порівнювали показники хімічних та біологічних сурфактантів. Всі біосурфактанти виявили значно меншу токсичність до тестового організму, ніж синтетичні [103]. Виявлено антивірусну дію рамноліпідів та їх комплексу з полісахаридами по відношенню до вірусу простого герпесу HSV 1 та HSV 2. Показано, що 50 %-на затримуюча концентрація рамноліпідів становить 14,5 мкг/мл для HSV 1 та 13 мкг/мл для HSV 2 та комплексу рамноліпідів 435 мкг/мл та 482 мкг/мл відповідно [104]. Рамноліпіди і Тритон X-100 затримують ріст *Vibrio cholerae* [105]. Культура *P. aeruginosa* LBI синтезує 6 гомологічних рамноліпідів, що чинять антимікробну дію на патогенні бактерії та гриби [106]. Низькі концентрації катіонних сурфактантів мають бактерицидний ефект, більший для грампозитивних бактерій. Аніоногенні та нейонні детергенти за концентрацій, нижчих 0,001-0,4%, не впливають на ріст дріжджів, але при більших дають помітний фунгіцидний ефект. При сумісному використанні ПАР з антибіотиками та іншими лікарськими препаратами може спостерігатись ефект підсилення їх дії (наприклад, тетрациклінів відносно грамнегативних мікроорганізмів).

## 1.7. Галузі застосування ПАР

**Застосування біоПАР у рослинництві.** Застосування ПАР є перспективним для підвищення врожайності рослин. Важливою функціональною особливістю ПАР є їх здатність підсилювати дію інших речовин, що входять до складу препаратів, вони можуть виступати як солюбілізатори нерозчинних чи малорозчинних сполук, що дозволяє

рослинам більш ефективно засвоювати поживні речовини. Вони здатні до підвищення біодоступності поживних речовин для рослин та підвищення активності засобів захисту рослин проти фітопатогенів [107]. Синтетичні поверхнево-активні речовини, що використовуються в даний час в складі пестицидів, діють як емульгатори, змочувачі та диспергуючі речовини, що підвищує їх дію [108]. Так, використання ПАР у комплексі з пестицидами Раундапом, Уталом, Форсатом у 2 рази знижує норми їх витрат і відповідно навантаження на рослини винограду та ґрунт [109]. Цьому сприяє захисна оболонка із міцел ПАР, котра забезпечує кращі умови для росту рослин. Показано, що передпосівна обробка насіння моркви, селери, цибулі шляхом їх замочування в осмотичних розчинах поліетиленгліколю 6000 (ПЕГ), гліцерину і калій фосфату сприяла збільшенню проростання насіння і схожості порівняно з контролем [110]. Інші синтетичні ПАР (натрій діоктілсульфосукцинат та алкілфенілоксиетилен) у композиціях з фунгіцидами (PP192, дихлорофен) в польових випробуваннях показали ефективність проти кили (*Plasmodiophora brassicae*) капусти та збільшення врожаю [111]. Проте, у комерційних препаратах використовують в основному синтетичні ПАР, які є шкідливими для довкілля, вони накопичується в ґрунті, ґрунтових водах, що впливає на довкілля та продукти рослинництва [112,113]. Крім того, синтетичні поверхнево-активні речовини вважаються потужними органічними забруднювачами ґрунту [114]. Біосурфактанти можуть замінити синтетичні поверхнево-активні речовини, що використовуються у сільському господарстві, оскільки ці природні ПАР, зокрема, використовуються в якості джерела вуглецю мікробами, які населяють ґрунти [115, 116, 117], і це пояснює їх біодеградабельність. Також перспективними для рослинництва є ПАР-синтезуючі мікроорганізми. Так, бактерії *Pseudomonas* sp. відомі як агенти біологічного контролю проти мікросклеротомії *Verticillium* [118]. Штами *Pseudomonas* sp. інгібують ріст патогенних грибів *Rhizoctonia solani* (викликає кілька захворювань рослин) і *Phythium ultimum* (викликає

в'янення і кореневу гниль) шляхом продукування двох ПАР - віскозину і віскозінамиду [119]. Рамноліпіди та феназин мають фунгіцидну дію щодо фітопатогена квасолі *Pythium* ssp. [120]. Максимальною антимікробною активністю володіють ПАР при ККМ нижче 100 мкг/мл. Повідомляється, що збудники антракозу листків папайї інгібуються біосурфактантом, продукованим *Bacillus subtilis*, виділеним з ґрунту [121]. Біосурфактанти, які володіють антагоністичними властивостями щодо фітопатогенів, можуть також впливати на інші складові екосистеми. Щоб забезпечити сприятливий ефект ризобактерій для рослин, дуже важливо, щоб ці мікроби взаємодіяли з рослинними поверхнями та корінням [122]. Для встановлення зв'язку з рослиною потрібні мікробні чинники, такі як рухливість, здатність утворювати біоплівки на поверхні кореня і вивільнення молекули, чутливі до кворуму (ацил-гомосерін лактон), необхідні для синтезу протигрибкових сполук ризобактеріями. Це і обумовлює перспективи біоПАР – високоефективних, і в той же час екологічно безпечних для створення сучасних агрозасобів та удосконалення існуючих.

**БіоПАР як інгібітори корозії.** У нафтогазовій промисловості для захисту металоконструкцій й обладнання при видобуванні, транспортуванні, переробці нафти, газу широко використовують інгібітори корозії металів, причому попит на ці продукти постійно зростає. Натепер однією з найбільш розповсюджених груп інгібіторів є засоби на основі ПАР. Встановлено [123], що ПАР можуть інгібувати корозію різних марок сталі в робочих середовищах нафтової промисловості. В Україні спостерігається дефіцит ресурсів для виробництва інгібіторів корозії, які часто імпортуються. Не менша проблема – екологічна, пов'язана із забрудненнями ґрунтів і води інгібіторами синтетичного походження. Для вирішення вказаних проблем перспективним є використання біоПАР - продуктів мікробного синтезу, проте вплив біоПАР на корозію металів практично не досліджено. Представляє інтерес вивчення механізму їх дії, впливу складу. Перспективним напрямком є поєднання ПАР та інгібіторів корозії інших

типів. Встановлено [123], що катіонні та нейоногенні ПАР підвищують ефективність інгібітора корозії *t-cinnamaldehyde*, вони збільшують адсорбцію інгібітора на поверхні металу, розчинність та дисперсність. У композиції з цинк сульфатом та кальцій глюконатом алкілглюкозид ефективно інгібує корозію сталі у морській воді [124]. Натепер є тільки окремі відомості про інгібувальну дію біоПАР, використання гліколіпиду *Torulopsis bombicola* дало ефект проти сульфідного корозійного розтріскування. Рамноліпідні ПАР фірми *Biosurfactant Co.* пропонуються як інгібітори корозії металів. Показано можливість застосування ПАР *P.fluorescens* для інгібування корозії сталі AISI 304, проте антикорозійний механізм їх дії не вивчався [125].

**Деструкція водонерозчинних речовин.** Рамноліпіди відіграють важливу роль у процесах засвоєння гідрофобних субстратів бактеріями роду *Pseudomonas*. Так, ріст різних штамів *P. aeruginosa* на *n*-гексадекані стимулювався рамноліпідом РЛ2. Цього ефекту не спостерігалось з бактеріями інших родів. Рамноліпід-негативні мутанти *P. aeruginosa* KY-4025 і *P. aeruginosa* PG 201 показували лише незначний ріст на *n*-парафінах та *n*-алканах у порівнянні з дикими штамми [126].

Припускають, що підсилення деструкції гідрофобного субстрату за допомогою рамноліпідів відбувається за двома механізмами. Перший – рамноліпіди збільшують доступність субстрату для клітин за рахунок утворення емульсій. Другий – рамноліпіди взаємодіють з клітиною збільшуючи гідрофобність її поверхні, що приводить до легшої асоціації між клітиною і субстратом. Дослідження механізму взаємодії рамноліпиду із клітинами бактерій роду *Pseudomonas* показали, що рамноліпіди викликають втрату ліпополісахариду, котрий знаходиться на поверхні клітин і є важливим гідрофільним компонентом поверхні клітини [127]. Таким чином, втрата ліпополісахариду збільшує спорідненість клітини до субстрату. Другий механізм є більш важливим для біодеградації вуглеводнів



*in situ*, оскільки для зміни гідрофільності клітинної поверхні потрібно значно менше рамноліпиду, ніж для емульгування гідрофобного субстрату.

Штами *Pseudomonas* є активними деструкторами нафтопродуктів [128-130]. Біодеградація октадекану в присутності 0,3 г/л рамноліпідів, синтезованих культурою *P.aeruginosa* ATCC 9027 збільшується на 15 % [131]. Це може бути пояснено збільшенням розчинності (солюбілізації) цього вуглеводню [132]. Механізм біодеградації за допомогою біоПАР складається з етапів [133]: ПАР оточує гідрофобну сполуку і збільшує її розчинність у міцелах; ПАР робить клітинну поверхню більш гідрофобною [134], таким чином покращуючи взаємодію мікроорганізму з органічним субстратом; клітина втрачає ЛПС, що збільшує гідрофобність поверхні. Штами *P. aeruginosa* UG-2, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG 1, *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066, *Rhodococcus erythropolis* ATCC 19558, *Rhodococcus erythropolis* BCG 112 ефективно деградували гексадекан. При чому додавання рамноліпідів стимулювало цей процес тільки у культури *P. aeruginosa* UG-2, а на інші штами ні додавання рамнолопідів, ні їх власних ПАР не впливало на засвоєння гексадекану [135]. У статті [136] досліджено роль рамноліпідів у деградації гексадекану та виявлено, що транспорт алканів у мікробні клітини проходить шляхом прямого контакту з великими краплями алкану і солюбілізацією. У порівнянні з синтетичними ПАР (Тритон Х-100) рамноліпіди проявляють більшу активність при деградації сміттєвих відходів [137]. Додавання рамноліпідів стимулювало біоре mediaцію бензину штамом *P. aeruginosa* DS10-129 [138]. Форма ПАР теж впливає на солюбілізацію та біодеградацію алканів, зокрема метилефірна форма рамноліпідів збільшувала деградацію гексадекану та октадекану сімома досліджуваними штамами *Pseudomonas*, тоді як кислотна форма – стимулювала засвоєння тільки штамами з менш гідрофобною клітинною стінкою [139]. Зокрема термофільний штам *Pseudomonas* APO2-1 протягом 7 діб засвоював 99% нафти (1%) та дизельного пального (2%) [140]. Додавання 0,01 % РЛ до мікробної асоціації збільшувало деградацію

ДП [141]. Біоремедіації забрудненої нафтою морської води на 59 % сприяло додавання рамноліпідів [142]. Успішне відновлення забруднених ґрунтів часто обмежується низькою біодоступністю гідрофобних забруднювачів, завдяки чому сповільнюється процес біоремедіації. Досліджували вплив високої температури (60°C) на деградацію вуглеводнів. Додавання рамноліпідів збільшило доступність алканів для мікробної асоціації, залишкова кількість вуглеводнів становила 71% при 60°C та 42 % при 18°C. Це пояснюється активізацією діяльності термофільної бактерії-деструктора *Geobacillus thermoleovorans* T80. Також при 60°C зростала кількість мікроорганізмів в ґрунті [143]. У статті [144] аналізували вплив на деградацію нафтового мулу (10-20%) асоціацій-деструкторів, рамноліпідів та мінеральних солей (N, P, K). Мінімальна кількість нафтопродуктів відмічена на 56 день експерименту та показано, що всі домішки мали значний ефект в біодеградації. Відмічений такий відсотковий залишковий склад різних фракцій нафтопродуктів: C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub> – 0%, C<sub>12</sub>-C<sub>21</sub> – 4-17%, C<sub>22</sub>-C<sub>31</sub> – 15-20%, C<sub>32</sub>-C<sub>40</sub> – 27-43%. На засвоєння дизельного пального також впливає концентрація доданих рамноліпідів [145], так, при додаванні 40 мг/л сурфактанту деградує 94 % ДП, тоді як в контролі без РЛ – тільки 40%, при вищих концентраціях (80-160 мг/л РЛ) результати аналогічні, при менших концентраціях – нижчі. Додавання рамноліпідів збільшувало деградацію вуглеводнів нафти протягом 10 днів від 32 до 61%, при чому ізопренів від 16 до 70%, алкільованих поліароматичних вуглеводнів від 9 до 44% [146]. Хімічна природа ПАР впливає на біодеградацію нафти. Додавання ДДС стимулює розклад аліфатичних вуглеводнів, а сапонінів – ароматичні [147].

Агресивними забруднювачами довкілля є також поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) [148] та хлорпохідні. Для їх знешкодження використовують мікроорганізми в поєднанні з ПАР – рамноліпідами [149, 150], ДДС та рамноліпідами [151], а також із використанням фітореємедіації. Виявлено, що сорбція фенатрену коренями жита збільшувалось із зростанням кількості доданих рамноліпідів [152]. У статті [153] показано,

що розкладання та солюбілізація ПАВ проходить інтенсивніше у присутності РЛ в концентрації вищій, ніж ККМ. Вивчали біоремедіацію забрудненого фенатреном та ДП піску [154]. Показано, що додавання РЛ стимулювало деградація фенатрену на 70%, а ДП – на 60%. Зокрема розчинність фенатрену у присутності РЛ збільшувалась в 4,5-5,5 разів [155, 156]. Ефективним деструктором нафталіну, антрацену, фенатрену [157], гексахлорбіфенілу є штам *Pseudomonas* UG-2 в сукупності з рамноліпідами та ДДС у концентрації 5 г/л [158], тетрахлоретилену - *Pseudomonas* ATTC 9027 у поєднанні з РЛ [159], пірену у поєднанні з RL штамом *Pseudomonas* 57SJ [160]. Біоремедіація ПАВ стимулювалась 100 мг/л РЛ [161]. У статті [162] вивчали вплив ПАР на деградацію хлорпохідних та показано, що рівень дехлорування не залежить від концентрації доданих рамноліпідів.

### ***Використання ПАР для створення нанорозмірних матеріалів.***

Застосування наночастинок в діапазоні від 1 до 100 нм є новою областю нанонауки та нанотехнологій. Наноматеріали застосовують для вирішення технологічних та екологічних проблем, таких як перетворення сонячної енергії, каталіз, медицина та очищення води [161]. Зростаючий попит на нанопродукти мусить супроводжуватись "зеленими" методами їх синтезу для зменшення небезпечних відходів. Срібні наночастинки сприяють підсиленню деяких потенційних властивостей у каталізі, магнітній та оптичній поляризації, електропровідності та антимікробній активності [162-165]. В даний час є багато методів синтезу нанорозмірних частинок срібла, таких як хімічне відновлення, фотохімічне відновлення, зворотні міцели та пластинчасті рідкокристалічні підходи, аерозольні та електростатичні розпилення [166-168]. Все більшої уваги набуває метод синтезу наночастинок металів у зворотних міцелах [169]. Проте, більшість поверхнево-активних речовин, які використовують у цьому процесі є хімічними, і, відповідно, токсичними для навколишнього середовища. Тому біосурфактанти як "зелені" стабілізатори мають багато переваг [170]. В роботі [171] вивчена можливість синтезу наночастинок срібла в

мікроемульсії «вода-в-олії», стабілізованій біосурфактом. В огляді [172] наведено поточні дослідження щодо використання біосурфактантів для біосинтезу металевих наночастинок та їх потенційної важливості. Для стабілізації наночастинок срібла в рідкій фазі використовували біосурфактант *P. aeruginosa*, синтезований на субстраті, що складається з 2,5% нафтопродуктів та 2,5% кукурудзяної муки. Частинки були спочатку синтезовані з використанням  $\text{NaBH}_4$  в якості відновника в зворотних міцелах біосурфактанту та були екстраговані з міцелярного розчину для диспергування в гептані. Отримали наночастинки срібла з розміром 1,13 нм. За спектрами поглинання в ультрафіолетовому випромінюванні припускали, що наночастинки срібла можуть синтезуватися в зворотних міцелах, вони є стабільними мінімум 3 місяці без додавання пасиватора. Трансмисійна електронна мікроскопія показала, що наночастинки срібла мають сферичну форму та відносно однорідні. Цей процес забезпечив простіший шлях синтезу наночастинок в порівнянні з існуючими [173].

Отже, для біоПАР характерні такі ж властивості, що і для синтетичних ПАР: критична концентрація міцелоутворення (ККМ), гідрофільно–ліпофільний баланс (ГЛБ), поверхневий і міжфазний натяг, стабілізація емульсій вуглеводнів, піноутворення тощо. Проте синтетичні ПАР, не дивлячись на їх унікальні властивості, є токсичними і важкодеградабельними. Перевагами біоПАР є висока ефективність, стійкість у широкому діапазоні значень температури, рН, концентрацій солей, а також біологічна активність (вплив на метаболізм мікроорганізмів, проникність клітинних мембран, активність ферментів тощо).

### Висновки до розділу 1

На різних за природою субстратах мікроорганізми здатні синтезувати широкий спектр поверхнево-активних сполук, які відрізняються між собою структурою, фізико-хімічними та біологічними властивостями.

Використовуючи в якості джерела вуглецю та енергії дешеві субстрати чи суміші можна інтенсифікувати синтез біомаси та рамноліпідів.

ПАР можуть виступати регуляторами мікробного обміну речовин, впливаючи на ріст та розвиток мікроорганізмів. Їх ефективність залежить від хімічної природи сурфактанту та виду мікроорганізму.

Для здешевлення процесів ферментації з метою отримання біоПАР доцільно мінімізувати витрати на субстрати (використовуючи економічно-вигідні чи відходи) та на очищення ПАР (спрощуючи методи), використовувати весь спектр синтезованих сполук – як з біомаси, так і з супернатанту культуральної рідини.

БіоПАР завдяки своїм фізико-хімічним та біологічним властивостям знижують поверхневий та міжфазний натяг, є ефективними емульгаторами, солюбілізаторами, змочувачами, піноутворювачами, сприяють проникненню біологічно активних речовин крізь мембрани, що створює перспективу їх застосування у сільському господарстві, для захисту металів від корозії та для ремедіації забруднених ґрунтів.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкти досліджень

У роботі використовували штами *Pseudomonas* sp. PS-17 (реєстр. *Pseudomonas* sp. IMB B-7434), *Pseudomonas aureofaciens* NB-1 з колекції ВФХГК ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України; *P.fluorescens* 8573 та інші штами роду *Pseudomonas*, а також культури *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia corotovora* з колекції відділу фітопатогенних бактерій IMB ім. Д.К. Заболотного НАН України, фітопатогенні гриби (*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia cerealis*) з колекції ДП «Ензим». Використовувались тестові мікроорганізми, отримані з кафедри ТБСФБ НУ «Львівська Політехніка», а також рослини – кукурудза, крес-салат, буряк столовий, соняшник олійний, ріпак, пшениця озима, люцерна, ячмінь ярий.

### 2.2. Мікробіологічні методи

**Культитивування мікроорганізмів** роду *Pseudomonas* проводили в лабораторних умовах в колбах Ерленмейера (750мл) на ротаційній качалці (220 об/хв.) при температурі 30°C на базовому мінеральному середовищі №1 наступного складу (г/дм<sup>3</sup>): NaNO<sub>3</sub> – 4,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O – 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5; цитрат Na – 4,0, дистильована вода – до 1 дм<sup>3</sup>.

Досліджувані джерела вуглецю та енергії додавали в кількості 2% мас, окрім гексадекану, якого брали 1% мас.

**Як інокулят** використовували 24-год культуру з експоненційної фази, вирощену на середовищі з гліцерином (2% мас) як джерелом вуглецю, культури бактерій *Pseudomonas* в експоненційній фазі росту (титр клітин  $2 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>), 10 % об.

Дослідження впливу співвідношення гліцерину, нітрату натрію та цитрату натрію як стимулятора синтезу ПАР проводили методом адитивно-решітчатих рівнянь із наступними співвідношеннями гліцерину, натрій нітрату і натрій цитрату, % мас: – 15:1:0; 20:2:1; 25:3:2; 30:4:3; 35:5:4; 40:6:5; 15:2:2; 20:3:3; 25:4:4; 30:5:5; 35:6:0; 40:1:1; 15:3:4; 20:4:5; 25:5:0; 30:6:1; 35:1:2; 40:2:3; 15:5:2; 20:6:4; 25:1:3; 30:2:5; 35:3:0; 40:4:1.

Для встановлення оптимального джерела вуглецю використовували наступні речовини: гліцерин, гексадекан (1% мас), соняшникову, соєву олію, глюкозу, спирт етиловий, глюкоза, фуз олійний, маніт, дизельне паливо, відходи виробництва біодизелю, всі субстрати (окрім гексадекану) та їх суміші взяті в концентрації 2% мас.

Дослідження впливу змішаних субстратів проводили з використанням таких сумішей джерел вуглецю: гексадекан і гліцерин (1:2, 1:4, 1:6), гексадекан і глюкоза (1:1), олія і гліцерин (1:2) та етанол з глюкозою (1:1).

Для визначення впливу ПАР на досліджувані штами їх культивували в присутності 0,1 та 0,05 г/дм<sup>3</sup> рамноліпідів. Вплив домішок глауконіту вивчали при культивуванні штамів на поживному середовищі, в яке додавали глауконіт в кількості 0,5 г/дм<sup>3</sup>.

**Визначення біомаси бактерій.** Біомасу клітин визначали ваговим та спектрофотометричним методом [174] на КФК-2 при 540 нм в кюветах 5мм. Для цього культуральну рідину розводили разів фосфатним буфером, вимірювали оптичну густину суспензій клітин і перераховували кількість біомаси за калібрувальним графіком.

При використанні поживних середовищ з вуглеводнями біомасу визначали ваговим методом у нашій модифікації: культуральну рідину центрифугували при 6000 об/хв впродовж 20 хв. при кімнатній температурі. Отриманий осад клітин промивали дистильованою водою й гексаном для видалення залишкових вуглеводнів, які використовували при культивуванні. Відмитий осад клітин сушили при 102°C до постійної маси .

**Визначення інгібувальної концентрації рамноліпідів.** Вплив рамноліпідів на ріст *Pseudomonas* sp. PS-17 та *P. fluorescens* 8573 вивчали методом заливки блоку в агаровій пластинці [174]. Досліджували вплив рамноліпідів у діапазоні концентрацій 0,001-10 г/дм<sup>3</sup>. Із агарової пластинки, що містить рамноліпідів, вирізували блок діаметром 15 мм (використовуючи металічну трубку з загостреними краями, стерилізовану спиртовим факелом). Вирізаний блок стерильним пінцетом поміщали на пусту чашку Петрі. Потім навкруг блока розливали тепле універсальне поживне середовище, попередньо засіяне дослідною культурою. Чашки Петрі витримували 12 год в холодильнику для дифузії рамноліпідів у середовище, термостатували 3 доби при 28°C, вимірювали зони затримки росту.

**Антимікробну активність** СКР штамів *Pseudomonas* щодо фітопатогенів *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027<sup>Т</sup>, *Clavibacter michiganensis* УКМ АС-630<sup>Т</sup>, *Agrobacterium tumefaciens* УКМ В-1000, *Erwinia amylovora* УКМ В-1104 та *Xanthomonas campestris* УКМ В-1049 з Української колекції мікроорганізмів оцінювали за мінімальними значеннями інгібувальної (МІК) і бактерицидної (МБК) концентрацій препаратів [175]. Досліджувані розчини СКР стерилізували в автоклаві і розливали в одноразові планшети з стерильним поживним середовищем, послідовно розводили та додавали 1-добову культуру мікроорганізмів-фітопатогенів  $1 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> у кількості 0,1 мл. Планшети витримували в термостаті при 37 С протягом 20 год. Мінімальна концентрація препарату, яка давала повну видиму затримку росту культури (прозорий бульйон) відповідала МІК даного препарату щодо тестових штамів, що визначало ступінь їх чутливості. Для визначення ступеня бактерицидної дії препарату із останніх прозорих лунок проводили висів на універсальне агаризоване середовище. За МБК дослідних препаратів приймали найменшу їх концентрацію у лунці, висів із якої після інкубації не давав росту на твердому середовищі.

**Культитивування мікроорганізмів у ферментері.** Культивування штамів проводили в лабораторному скляному ферментері об'ємом 5 дм<sup>3</sup> з



використанням оптимізованого поживного середовища. Робочий об'єм становив 2 – 3 дм<sup>3</sup>. Стерилізацію ферментера проводили разом з поживним середовищем упродовж 40 хв за температури 132 °С.

Посівний матеріал вносили в кількості 10% від об'єму середовища. Тривалість культивування посівного матеріалу – 12, 24 та 36 год.

У процесі ферментації контролювали концентрацію біомаси, рафноліпідів, рН середовища, температуру, концентрація розчиненого кисню в культуральній рідині. Значення рН середовища, температури, вмісту розчиненого кисню визначали за допомогою відповідних електродів автоматичним аналізатором "Експерт-001-4.0.1" (ООО "Эконикс-Эксперт", Росія) в режимі реального часу. Температуру підтримували термостатуванням зовнішнім змієвиком в оболонці реактора.

Аерацію культурального середовища здійснювали за допомогою компресора (SERA air550R, "Sera", Germany) з витратою повітря 0,25 – 6 м<sup>3</sup>/(м<sup>3</sup>·хв) та контролювали лабораторним ротаметром.

Перемішування проводили за допомогою дволопатевої турбінної мішалки з нижнім приводом при швидкості 100 – 1000 хв<sup>-1</sup>.

### 2.3. Методи виділення продуктів

*Виділення поверхнево-активного біокомплексу* проводили із супернатанту культуральної рідини [176] підкисленням до рН 3-4,0 (на рН-метрі Експерт 001) розбавленими або концентрованими кислотами (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COOH). Після підкислення осад витримували при температурі 100°C упродовж 25 хв, охолоджували до кімнатної температури, відділяли центрифугуванням (8000 об/хв, 20 хв.). Надосадову рідину (НОР) декантували, рафноліпідні ПАР були сконцентровані в нижній фазі. Для порівняння використовували біокомплекс, отриманий підкисленням СКР з наступним його охолодженням при 4° С упродовж ночі (12-16 годин) та центрифугуванням при таких же умовах. Отриманий осад

висушували при 102°C до постійної маси. Вміст біокомплексу, що складається з рамноліпідів, полісахаридів та білку визначали гравіметрично.

**Екстракцію ліпідів з надосадових рідин**, отриманих при виділенні комплексу проводили шляхом екстракції СКР сумішшю розчинників етилацетат-ізопропанол (2:1).

**Екстракцію ліпідів з супернатантів КР** проводили СКР [177] сумішшю розчинників – Фолча (хлороформ-метанол (2:1) з подальшим відділенням органічної фази. Розчинник упарювали у вакуумі. Для вибору оптимального екстрагента методом багатопараметрових рівнянь поверхнево-активні речовини із СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1 і *P. fluorescens* 8573 виділяли шляхом одноразової екстракції подвійними кількостями розчинників: гексан, октан, бензол, толуол, хлороформ, тетрахлорметан, ізобутанол, бутанол, пентанол, амілацетат, етилацетат, бутилацетат, діетиловий ефір.

**Екстракція ліпідів з біокомплексу** проводили шляхом одноразової екстракції 1 г вологого комплексу (70% сухої речовини) наступними розчинниками: хлороформ, діетиловий ефір, бензол, тетрахлоретан, гексан, етилацетат, циклогексанон, амілацетат, бутилацетат, дихлоретан, бутанол у кількості 20 мл з подальшим упарюванням екстракту під вакуумом.

**Виділення полігідроксиалконоатів з біомаси.** Біомасу бактерій *Pseudomonas* отримували центрифугуванням КР при 6000 об/хв протягом 15 хв. Двічі промивали розчином NaCl (0,89% мас.), знову 15 хв центрифугували, осад збирали, сушили при 60° С протягом 24 год до постійної маси, охолоджували, витримували в ексикаторі для подальшого використання. Сухі клітини дезінтегрували додаванням 10 г/дм<sup>3</sup> натрій додецилсульфату, перемішуванням упродовж 15 хв для ефективної солюбілізації ліпідів і білка під дією ультразвуку (УЗМ-001). Потім його додатково обробляли 30%-ним натрій гіпохлоритом (NaClO) протягом 3 хв для видалення пептидоглікану і залишків біомаси. Після 15-хв центрифугування (6000 об/хв), осад переносили в колбу й екстрагували

хлороформом. Органічну фазу відбирали та упарювали у вакуумі [178]. За альтернативною методикою культуральну рідину штамів *Pseudomonas* автоклаували при 1 атм 5 хв для дезінтеграції біомаси, декантували, осад промивали водою і висушували до постійної маси.

## 2.4. Аналітичні методи

**Ідентифікація ліпідів.** Якісний аналіз і препаративне виділення ліпідів проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 (“Merck”) у системах розчинників [179]: а) для полярних ліпідів: хлороформ-метанол-ацетон-оцтова кислота (90:10:6:1); б) для неполярних ліпідів: гексан-діетиловий ефір-оцтова кислота (90:10:1). Ідентифікацію ліпідів проводили шляхом візуалізації пластинок за допомогою специфічних реагентів: а) 5%-ого спиртового розчину фосфорномолібденової кислоти (загальні ліпіди), б) орцинового реагенту (рамноліпіди). Орциновий реагент готували розчиненням 0,2г орцину в 5 мл сірчаної кислоти, після чого додавали 5 мл етанолу при охолодженні, в) анісальдегіду, приготованого наступним чином: до 1 мл анісальдегіду додавали 9 мл етанолу, 1 мл концентрованої сірчаної кислоти та 0,1 мл крижаної оцтової кислоти, г) антронового реагенту – до 0,5 г антрону додавали 25 мл концентрованої сірчаної кислоти, доводили метанолом до 50 мл, охолоджуючи. Пластинки проявляли при 110°C. Для ідентифікації застосовували рамноліпіди як маркери.

**Визначення концентрації рамноліпідів** у культуральній рідині проводили методом спектрофотометрії КФК-2 [177]. 5 мл зразку (рН 4,0) екстрагували двічі 5 мл суміші Фолча. Після видалення органічної фази на вакуумному випаровувачі екстракт розчиняли у дистильованій воді до концентрації рамнози 25 мг/дм<sup>3</sup>. 1 мл водного розчину екстракту ліпідів швидко перемішують з 5 мл орцинового реактиву (0,2г орцину розчиняють в 100 мл концентрованої сірчаної кислоти) при охолодженні. Потім зразки

витримували 15 хв при 90°C. Оптичну густину визначали при 420 нм на КФК-2. Калібрувальний графік будували за рамнозою.

**Метод виділення полісахариду.** Полісахарид виділяли з супернатанту КР осадженням 2 об'ємами етанолу [180]. Витримували впродовж 12 год при 4°C, отриманий аморфний осад відділяли центрифугуванням при 6000g впродовж 15 хв. Очистку продукту переосадженням з дистильованої води проводили двічі, сушили при 102°C до постійної маси.

**Концентрацію полісахаридів** визначали ваговим та спектрофотометричним методом із застосуванням фенолу і сірчаної кислоти. Фенол у присутності сірчаної кислоти дає кольорову реакцію з цукрами та їх похідними. 15 мл СКР розводили у кілька разів дистильованою водою так, щоб розчин містив 10-80 мкг полісахариду. До 2 мл отриманого розчину додавали 1 мл 5% фенолу. Потім різко додавали 5 мл концентрованої сірчаної кислоти і перемішували. Пробірки залишали на 20 хв при кімнатній температурі, після чого струшували і нагрівали на водяній бані при 30°C впродовж 20 хв. Потім пробірки залишали на 40 хв при кімнатній температурі для стабілізації кольору.

Оптичну густину розчинів вимірювали на КФК-2 при 490 нм і перераховували кількість полісахаридів за калібрувальним графіком.

**Екстракцію бензпірену** з ґрунтових екстрактів проводили за методом [181]. Перед тим, як взяти пробу ґрунтового екстракту, розчин вимішували 10 хв для гомогенізації. Проби брали в кількості 10 мл, з них 4 мл – для аналізу на бензпірен. Екстракцію проводили з 5 мл дихлорметану, перемішуючи протягом 3 хв, після розділення водну фазу відбирали. Екстракт бензпірену в дихлорметані очищували на колонці, наповненій 1г сорбенту Florisil 60 - 100 меш фірми LGC Promochem (прогрітий при 120°C, з додаванням 9% води) і 0,5г безводного натрій сульфату. Елюат збирали в калібрувальну пробірку, випарювали до 3 мл в азоті, 1,5 мл переносили в пробірку, екстракт аналізували методом газової хроматографії [181] на

газовому хроматографі HP 6890 GC фірми Hewlett-Packard з полум'яно-йонізаційним детектором (FID) і автоматичним дозатором, з капілярною колонкою HP-5 (5% Phenyl Methyl Siloxane) 30мх320ммх0,25мм. Умови розділення: дозатор автоматичний об'єм 1мкл, split 10:1, температура дозатора – 280°C; газ-носії азот (чистота 5.0), швидкість проходження – 1 мл/хв; температура випарювача програмована: 80°C (2 хв.), ріст 12°C/хв до 280°C протягом 8 хв; детектор FID, температура 310°C, швидкість: водню – 30 мл/хв., повітря – 300 мл/хв, азоту – 30 мл/хв. Калібрування хроматографа – за допомогою стандартних розчинів бензпірену в метанолі (4,0 – 150 нг/мкл). Час виходу бензпірену складав від 23,05 до 23,09 хвилин. Кількісне визначення бензпірену проведено методом зовнішнього стандарту, концентрацію обчислювали за площею піку на хроматографі, контроль – проби ґрунтового екстракту без бензпірену. Відтворювання результатів перевірено на пробах ґрунтового екстракту з визначеними кількостями бензпірену.

**Визначення вмісту неполярних аліфатичних вуглеводнів** проводили екстракцією тетрахлоретаном з подальшим відділенням полярних сполук на активованому алюміній оксиді та визначенні вмісту залишкових аліфатичних вуглеводнів [182] на ІЧ-спектрометрі SPECORD-80 в області 3200 – 2800 см<sup>-1</sup> (смуга – 2926 см<sup>-1</sup>). Для калібрувальної кривої використано розчин вуглеводнів: 37,5% н-гексадекану, 37,5% ізооктану, 25% бензолу.

## 2.5. Фізико-хімічні методи

**Методи визначення поверхневого натягу.** Поверхневий натяг визначали методом Дюнуї з платиновим кільцем [184] або на тензіометрі KRÜSS DSA-10 з наступною комп'ютерною обробкою.

**Визначення значень критичної концентрації міцелоутворення і CMC.** Для визначення ККМ досліджуваних біоПАР готували серію їх

розведень відомої концентрації і вимірювали поверхневий натяг при кожному розведенні, будували графік залежності ПН від логарифму концентрації ПАР. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає точці ККМ ( $\text{мг/дм}^3$ ) [184]. Для вимірювання відносної концентрації біоПАР користувалися показником розведення супернатанту культуральної рідини, який позначали як CMD (*Critical micelle delution*) [185]. Для визначення CMD вимірювали поверхневий натяг ряду послідовних розведень СКР, будували графік залежності ПН від логарифму розведення СКР. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає точці CMD.

**Визначення емульгувальної активності** біоПАР проводили методом [186] у нашій модифікації: 10 мл водного розчину біоПАР (СКР або біокомплексу) перемішували з 10 мл відповідних вуглеводнів (вазелінова олива, нафта, рідкі парафіни, рослинні олії, мастило, бензол, гексадекан, циклогексаном) 2 хв на гомогенізаторі “Ми-2”, суміш переносили у вимірювальну пробірку NS-14 із внутрішнім діаметром 12 мм. Індексуемульгування ( $E_{24}$ ) визначали через 24 год як відношення висоти емульсійного шару до загальної висоти рідини у пробірці. Для оцінки процесу старіння емульсії покази знімали у динаміці.

**Піноутворювальну здатність** біоПАР визначали за ДСТУ 3789-98 [187]. 100 мл СКР струшували в градуйованій ємності 1 хв, вимірювали висоту стовпа піни. Коефіцієнт стійкості піни – відношення об'єму піни через 5 хв до початкового об'єму піни. Кратність піни – відношення початкового об'єму рідини до об'єму з піною.

**Крайові кути змочування.** Крайові кути змочування надосадовими рідинами різних матеріалів визначали на катетометрі КМ-8.

**Визначення гідрофільно-ліпофільного балансу** (ГЛБ) проводили із використанням рівняння (2.1) за хімічною формулою ПАР [188]:

$$HLB=7+\sum HLB_c - \sum HLB_l, \quad (2.1)$$

де  $\Sigma\text{HLB}_\Gamma$  – сумарний показник гідрофільності груп сурфактанту;  
 $\Sigma\text{HLB}_\text{л}$  – сумарний показник ліпофільності груп сурфактанту.

Показники гідро- і ліпофільності груп визначали на основі табличних даних (табл. 2.1).

Таблиця 2.1.

**Залежність показника гідро- або ліпофільності від хімічної будови сполуки**

Функціональна група сурфактанта		Показник гідро- або ліпофільності сполуки
Гідрофільні групи	-SO <sub>4</sub> Na <sup>+</sup>	38,7
	-COO-K <sup>+</sup>	21,2
	-COO-Na <sup>+</sup>	19,1
	N (третинні аміни)	9,4
	Складна ефірна	6,8
	проста ефірна	2,4
	-COOH	2,1
	-O-	1,3
	CH (циклічна)	0,5
	-OH	1,9
Ліофільні групи	=CH-	0,475
	-CH <sub>2</sub> -	
	-CH <sub>3</sub>	
	=C=	
Похідні	-(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O)-	0,33
	-(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O)-	0,15

**Солюбілізаційну здатність** визначали в скляних пробірках з корком, об'ємом 10 мл з нижнім отвором з силіконом, крізь який для аналізування відбирали взірці водної фази [189]. До взірців додавали по 5 мл розчину відповідних ПАР та 0,5 мл до декану, закривали тефлоновим корком, струшували 24 год на качалці IKA VIBRAX VXR Basic при 1500 об/хв., після 24 год проби центрифугували на MPW 250R при 5000 об/хв, 15-30 хв до розділення фаз. Взірці термостатували 96 год за 23±0,5°C для досягнення рівноваги солюбілізації. Концентрацію додекану у водній фазі визначали на хроматографі Chrompack CP 9001 (Varian Inc.), з FID, газ-носії – водень,

капілярна колонка 30 м, внутрішнім діаметром 0,32 мм, рідка фаза – ХТІ-5 (5% дифеніл-95% диметилполісилоксану). Температура інжектора і детектора – 250°C. Температура визначення додекану – 180°C. Ефективність оцінювали за коефіцієнтом солюбілізації. Масовий коефіцієнт солюбілізації (МКС) обчислювали за графіками залежності вмісту солюбілізованого додекану від вмісту ПАР. На основі отриманих МКС визначали молярний коефіцієнт солюбілізації за формулою (2.2):

$$Mr_{KC} = M_{KC} \cdot \frac{Mr_{\text{сурф}}}{Mr_{\text{орг}}} \quad (2.2)$$

де  $Mr_{\text{сурф}}$  – молекулярна маса сурфактанту, г/л;  $Mr_{\text{орг}}$  – молекулярна маса солюбілізованої сполуки, г/дм<sup>3</sup>

**Визначення молекулярної маси біокомплексу** проводили із застосуванням віскозиметру скляного капілярного ВПЖ-1 за стандартною методикою [190] за величиною характеристичної в'язкості (2.3), що пов'язана з розмірами та формою макромолекул у розчині.

$$[\eta] = K M^{\alpha} \quad (2.3)$$

де  $[\eta]$  – характеристична в'язкість;  $K$  та  $\alpha$  – константи Марка-Куна-Хаувінка;  $M$  – молекулярна маса.

Прологарифмувавши рівняння (2.3) отримували (2.4), за яким графічно визначали молекулярну масу речовини.

$$\ln[\eta] = \ln K + \alpha \ln[M] \quad (2.4)$$

Приведена в'язкість розчину, що витікає з віскозиметру:

$$[\eta] = (t - t_s) / tsc, \quad (2.5)$$

де  $c$  – концентрація речовини в розчині, г/дл;  $t_s$  – час витікання дист. води з віскозиметра, с;  $t$  – час витікання розчину з віскозиметра, с.

Як стандарт використовували полісахариди (Merck): декстран блакитний ( $M_r$  2 млн), декстран Д ( $M_r$  500 тис), декстран Т-40 ( $M_r$  44,4 тис), декстран Т-20 ( $M_r$  23 тис). РБК використовували за концентрації 0,5%. Величину характеристичної в'язкості розраховували за часом витікання розчинів. Молекулярну масу визначали за калібрувальною кривою.



## 2.6. Математичні методи

**Метод адитивно-решітчатих рівнянь.** Метод базується на використанні адитивної функції для опису залежності вихідного параметра, за яким здійснюється оптимізація, від вхідних величин, які оптимізуються [191]. Складові функції представлені як решітчасті рівняння і відображаються графічно. У досліді для оптимізації обрані вміст у поживному середовищі гліцерину (джерела вуглецю), натрій нітрату (азоту) і натрій цитрату на 6-и рівнях. У процесі культивування визначали кількість біомаси, рамноліпідів, полісахаридів і рамноліпідного біокомплексу. Експериментальні дані використано для розрахунків, отримуючи адитивно-решітчасті функції для кожного компонента.

**Підбір оптимального екстрагента** методом багатопараметрових рівнянь заснованого на принципі лінійності вільних енергій. Відомо, що в процесах екстракції (розподілу речовин між двома фазами) можливе встановлення зв'язку між константою розподілу та фізико-хімічними властивостями екстрагентів з використанням принципу лінійності вільних енергій. Узагальнюючи значення логарифмів констант розподілу екстрагованої речовини для 6-10 і більше розчинників, можна одержати багатопараметрове рівняння, що дозволяє спрогнозувати величини логарифмів для інших, недосліджених екстрагентів, а також отримати дані про хімізм екстракції. Найефективнішим було 6-параметрове рівняння (2.6):

$$\lg P = a_0 + a_1(n^2 - 1)/(n^2 + 2) + a_2(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1) + a_3B + a_4E_T + a_5\delta^2 + a_6V_M \quad (2.6)$$

де  $n$  - показник заломлення;  $\varepsilon$  - діелектрична проникливість органічного розчинника, які визначають його поляризованість і полярність, відповідальні за неспецифічну сольватацію розподілюваної речовини;  $B$  - основність по Пальму;  $E_T$  - електрофільність по Райхардту [192]. Квадрат параметра Гільдебранда ( $\delta^2$ ) та мольний об'єм  $V_M$  характеризують структурні особливості екстрагенту [193]. Значення поодиноких членів перевіряли згідно з рекомендаціями групи по кореляційному аналізу в хімії

при IUPAC [194] шляхом почергового виключення поодиноких членів з визначенням величини  $R$  одержаних рівнянь з меншим числом членів. За принципом вільних енергій, зміна рівноваги у міжфазовому переході сполуки є пропорційною логарифму коефіцієнту розподілу, але не вмісту самої сполуки. Оскільки біоПАР є складними сумішами, розраховували масу рамноліпідних ПАР, які переходили із водної фази в 1 моль екстрагенту (P), перерахунок проводили із масових кількостей.

**Спектральні дослідження.** Для ідентифікації і вивчення структури одержаних біоПАР штамів *Pseudomonas* використовували метод ІЧ-спектроскопії (у хлороформі або у таблетках KBr) на спектрометрі Termo-Nicolet-380, США)  $4000-400\text{ см}^{-1}$  при роздільній здатності  $2\text{ см}^{-1}$ .

## 2.7. Біологічні методи

Визначення **проникності клітинних** мембран під дією ПАР проводили за методом [195]. Зміну проникності фіксували по виходу позаклітинного білка, концентрацію якого визначали за методом Бредфорд [196]. Використовували наступні тестові штами мікроорганізмів, отримані з колекції мікроорганізмів кафедри ТБСФБ НУ „Львівська Політехніка”: *A.tumefaciens*, *E.coli*, *B.mesentericus*, *M.luteum*, *C.lipolytica*, *P.aeruginosa*.

Культури мікроорганізмів вирощували на м'ясо-пептонному агарі, готували суспензії клітин у фосфатному буфері рН 7,5 оптичною густиною 0,25-0,3 ( $\lambda$  540 нм), додавали біоПАР різних концентрацій, витримували при кімнатній температурі 1 год та визначали вміст білку. Вивчали вплив на проникність клітинних мембран наступних ПАР: рамноліпідний біокомплекс, рамноліпіди, натрій додецилсульфат, Твін-80 (0,0001-1%).

**Токсикологічні дослідження** проводили методом біотестування на ракоподібних *Daphnia magna* STRAUS [197] за стандартизованою методикою ДСТУ 4173:2003, що відповідає міжнародному стандарту ISO 6341:1996, MOD. Біотестування проводили у приміщенні без шкідливих

парів та газів, при розсіяному світлі, природній зміні дня і ночі, температурі води  $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$ , концентрації кисню у воді на початку біотестування не менше  $6\text{ мг/дм}^3$  і не менше  $2\text{ мг/дм}^3$  у кінці. ЛК50-24  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  для культури повинна знаходитись в інтервалі  $1,0\text{--}2,5\text{ мг/дм}^3$ . По 100 мл дослідних розчинів наливали у склянки, контрольні склянки наповнювали дехлорованою (відстояна 7 діб та аерованою) водою, у 3-х повторях. У кожну посудину поміщали по 10 дафній віком до 24 год. Тривалість біотестування до 96 год, під час тесту дафній не годували. Через 1, 6, 24, 48 і 96 год біотестування у кожній посудині візуально підраховували кількість живих дафній. За кількістю живих дафній у контролі та досліді визначали середні арифметичні для розрахунку числа загиблених дафній (2.7):

$$A = (x_k - x_d) / x_k * 100, \quad (2.7)$$

де  $A$  – кількість загиблених дафній у досліді, %;  $x_k$  – середнє арифметичне кількості живих дафній у контролі, екземпляри;  $x_d$  – середнє арифметичне кількості живих дафній у досліді, екземпляри.

Якщо  $A \geq 50\%$ , то дослідна проба виявляє гостру летальну токсичність. Для виявлення найбільш токсичних проб визначали рівень їх гострої летальної токсичності. Для цього порівнювали час закінчення біотестування проб, які аналізувались. Чим менший час, протягом якого виявлено гостру летальну дію проби на тест-об'єкт, тим вища гостра летальна токсичність за існуючою класифікацією (табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

#### Залежність токсичності розчинів ПАР від часу біотестування

Характеристика розчину за рівнем гострої летальної токсичності	Час закінчення біотестування, год	Кількість загиблених дафній, %
Не виявляє гострої летальної токсичності	96	<50
Слаботоксична	96	$\geq 50$
Помірно токсична	48	$\geq 50$
середньотоксична	24	$\geq 50$
Високотоксична	6	$\geq 50$
Надзвичайно токсична	1	$\geq 50$

**Вегетаційні дослід з рослинами.** Насіння кукурудзи, крес-салату (тест на фітотоксичність), соняшника олійного, ріпаку, пшениці озимої, замочували на 3 год у розчинах біоПАР (СКР, РБК у концентраціях 0,01 г/дм<sup>3</sup> ПАР). Контроль – насіння, замочене у дистильованій воді. Повторність дослідів з насінням – по 100 шт. Оброблене насіння розкладали у чашки Петрі на вологий фільтрувальний папір (у тесті на фітотоксичність), висаджували у ємності з ґрунтом чи на ділянки, в залежності від типу експерименту. Проростання та схожість насіння визначали згідно з ДСТУ 4138-2002 [198]. Через 3 доби аналізували морфометричні показники. У дрібноділянкових експериментах облік надземної та кореневої маси проводили на 30 добу після проростання насіння. Визначення сухої надземної та кореневої маси рослин проводили ваговим методом після висушування на повітрі при кімнатній температурі.

Насіння стерилізували сумішшю пероксиду водню з етанолом (1:1), 5 хв, промивали водою та замочували у розчинах ПАР впродовж 3 год. Розкладали у чашки Петрі або лотки. Результати: підраховували кількість пророслих насінин на 3 добу (енергія проростання) та 5-7 добу (схожість).

**Дрібноділянкові і польові дослід.** Насіння замочували на 3 години в розчинах ПАР ( 0,01 г/дм<sup>3</sup>) і вирощували у ґрунті протягом 3-х місяців, після чого визначали ростові показники рослин за стандартними методиками [199]. Умови експериментів: темно-сірий лісовий легкосуглинковий ґрунт (рН 5,4-5,7), площа дослідних ділянок – 10 м<sup>2</sup>. Мінеральні добрива вносили в нормі N<sub>30</sub>P<sub>60</sub>K<sub>60</sub>. Титр клітин у бактеріальному препараті - 2х10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>.

**У вегетаційних дослідях** по впливу біоПАР на мікроорганізми-азотфіксатори застосовували середовища:

- для бобових рослин, г/дм<sup>3</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O – 0,5; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0,2; NaCl – 0,1; Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> – 2,0; FeSO<sub>4</sub> – 0,01; агар-агар – 8,0; рН – 7,0 [198]

- середовище Фареуса (г/дм<sup>3</sup>): CaCl<sub>2</sub> – 0,1; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0,12; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,1; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O – 0,15; ферум цитрат– 0,005; агар– 8,0, рН – 7,0, додавали розчин мікроелементів (1,0 мл/дм<sup>3</sup>), рН – 6,8-7,0 [200].

У ємностях (1 кг) проводили вегетаційні досліді ( ячмінь ) на поживному середовищі Гельрігеля, г/кг піску: Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O - 0,492; FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O – 0,025; KCl – 0,075; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,136; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0,123 [200]. Мікроелементи (г/дм<sup>3</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 0,5; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 1,0; CaCO<sub>3</sub>– 5,0; рН – 6,8-7,0 вносили по 1 мл/кг піску [174].

Насіння стерилізували 5-10 хв. у суміші 95%-го етанолу і 33%-го пероксиду водню 1:1, промивали тричі стерильною водою, висушували.

**Передпосівне оброблення** насіння дослідних рослин проводили шляхом замочування у розчинах відповідних ПАР впродовж 3 год, контроль - вода. розкладали у лотки на вологий фільтрувальний папір. Повторність дослідів 4-х кратна. Вплив ПАР оцінювали за проростанням, розмірами проростків згідно зДСТУ 4138-2002 [198].

**Для стерильних мікровегетаційних дослідів** (пробіркові досліді) насіння люцерни сорту Роксолана та вики озимої сорту Львів'янка калібрували за розміром, поверхнево стерилізували сумішшю етанолу та пероксиду водню (1:1), обробляли розчинами рамноліпідів за концентрацій 0,05 та 0,01 г/дм<sup>3</sup> упродовж 1 год. та інокулювали культурою *S. meliloti* ЛН11. Інокулят для оброблення насіння вирощували 3 доби. Загальне бактеріальне навантаження 2x10<sup>6</sup> клітин на одну насініну. В контрольному варіанті насіння обробляли стерильною водопровідною водою.

Оброблене насіння пророщували на чашках Петрі із стерильним середовищем «R» 3 доби, після чого переносили (по 2 шт.) в стерильні пробірки ємністю 75 мл з агаризованим середовищем Фареуса [200]. Ефективність інокуляції оцінювали на 30 добу після проростання насіння за кількістю утворених бульбочок та сформованою зеленою масою.

Використовували бактерії *Enterobacter* sp. – для ячменю ярого сорту Княжий; *S. meliloti* ЛН11 - для люцерни сорту Роксолана. Азотфіксатори

виросщували на поживних середовищах з РБК (0,05 г/дм<sup>3</sup>), які вносили при культивуванні або у готову культуру, титр клітин -  $2 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>.

## 2.8. Методи визначення корозійної стійкості

*Інгібування корозії* сталі Ст3 вивчали за кімнатної температури гравіметрично (за швидкістю, показником корозії, ступенем захисту) за наступною методикою [201]. Зважені сталеві пластини повністю занурювали у мірні стакани з підготованими композиціями або водою (контроль) у кількості 200 мл та витримували упродовж 7 діб. Потім пластинки промивали, очищували та підсушували. Швидкість корозії визначали гравіметрично та розраховували за формулою 2.8:

$$K_m = (m_1 - m_2) / S \cdot \tau, \quad (2.8)$$

де:  $m_1$  – початкова вага зразка, г;  $m_2$  – вага зразка після експозиції в корозивному середовищі та усуненні продуктів корозії, г;  $S$  – загальна площа зразка, см<sup>2</sup>;  $\tau$  – час експозиції зразка в корозійному середовищі, год.

Сступінь захисту  $Z$  розраховували за формулою 2.9:

$$Z, \% = (K_m - K_i / K_m) \cdot 100\%, \quad (2.9)$$

де:  $K_m$  і  $K_i$  – швидкість корозії в неінгібованому та інгібованому середовищі відповідно.

Глибинний показник швидкості корозії розраховували за 2.10:

$$П = (K_m / \rho) 10^{-3}, \quad (2.10)$$

де:  $K_m$  – швидкість корозії, г/м<sup>2</sup> год,  $\rho$  – густина металу, г/см<sup>3</sup>

та методом потенціодинамічної поляризації на потенціостаті Gill за умов кімнатної температури методом потенціодинамічної поляризації на потенціостаті Gill AC, швидкість розгортки потенціалу – 2 мВ/с. Вимірювання здійснювали за триелектродною схемою: робочий електрод — сплав Д16Т, електрод порівняння — хлоридсрібний насичений, допоміжний — платиновий. Корозійним середовищем був 1 % р-н натрій хлориду [202].

## 2.9. Синтез наночастинок срібла

**Наночастинки срібла** синтезували в скляному термостатованому реакторі, обладнаному магнітною мішалкою, при 70 °С. В типовому експерименті до 100 мл розчину з концентрацією рамноліпідних ПАР 1 г/дм<sup>3</sup> додавали 1 мл 0,1 М розчину AgNO<sub>3</sub> і витримували при постійному перемішуванні протягом 1 год. Отримані колоїдні розчини срібла досліджували з використанням спектрофотометра *Shimadzu Uvmini-1240* та досліджували антимікробну активність.

## 2.10. Статистичний аналіз

Біологічна та аналітична повторність усіх досліджень чотириразова. Наведені у таблицях дані представлені у вигляді середнього значення та довірчого інтервалу, в якому із імовірністю 95 % буде знаходитися середній результат. Для статистичного аналізу достовірності експериментальних даних використовували методи варіаційної статистики [203] та обробки даних за програмою Origin 6.1 та Excel. Прогнозування біологічної активності здійснювали за допомогою комп'ютерної програми PASS. Планування і проведення польових дослідів та статистичну обробку даних проводили за Б.А. Доспеховим [199].

## Висновки до розділу 2

Таким чином, у Розділі 2 наведені об'єкти досліджень, а також методи, методики проведення експериментів, використані матеріали та обладнання, що були спрямовані на вирішення мети і завдань, поставлених у дисертаційній роботі.

### РОЗДІЛ 3. СИНТЕЗ ПАР ШТАМАМИ РОДУ *PSEUDOMONAS*

#### 3.1. Скринінг бактерій роду *Pseudomonas* як продуцентів ПАР

Проведено скринінг штамів бактерій роду *Pseudomonas* – потенційних продуцентів поверхнево-активних сполук. ПАР-синтезуюча здатність оцінювалася за показниками поверхневого натягу супернатанту культуральної рідини, CMD та індексом емульгування. Дослідження проведені у співпраці з відділом фітопатогенних бактерій ІМБ ім. Д.К.Заболотного НАН України.

ПАР-синтезувальну здатність вивчали у штамів трьох патоварів *Pseudomonas syringae*: рв. *coronafaciens* (10 штамів), *P. syringae* рв. *atrofaciens* (14 штамів), *P. syringae* рв. *syringae* 8511, а також у *Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1, *Pseudomonas* sp. PS-17, *P. stutzeri* N-12, *P. stutzeri* N-14, *P. fluorescens* 20 та *P. aeruginosa* S-7 (табл.3.1).

Таблиця. 3.1.

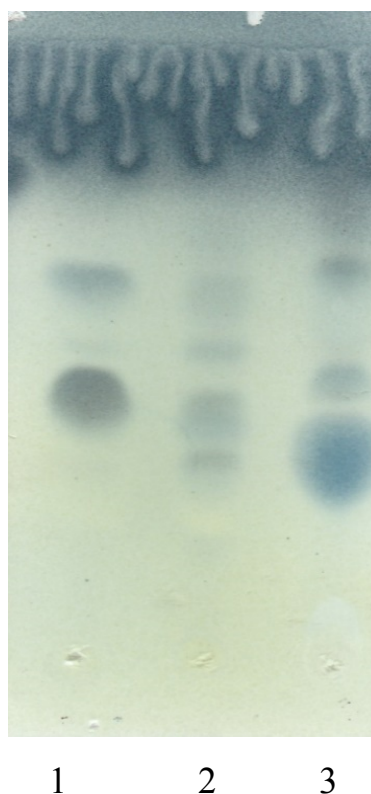
#### Поверхнево-активні характеристики штамів роду *Pseudomonas*

Штами роду <i>Pseudomonas</i>	Поверхневий натяг, $\sigma$ , мН/м	Індекс емульгування, $E_{24}$ , %
<i>P. pv. syringae</i> 8511	53,8 $\pm$ 0,5	0,9
<i>P. pv.coronafaciens</i> , 10 штамів	43,0-53,0 $\pm$ 0,6	1,0-3,5
<i>P. pv.atrofaciens</i> , 14 штамів	46,8-55,3 $\pm$ 0,5	0,9-2,6
<i>P. fluorescens</i> 8573	27,00 $\pm$ 0,5	50,0
<i>P. aureofaciens</i> NB-1	26,00 $\pm$ 0,4	50,0
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	28,00 $\pm$ 0,5	60,00
<i>P. stutzeri</i> N-12	36,4 $\pm$ 0,4	25,0
<i>P. stutzeri</i> N-14	46,3 $\pm$ 0,5	21,5
<i>P. fluorescens</i> 20	29,3 $\pm$ 0,5	10,0
<i>P. aeruginosa</i> S-7	30,3 $\pm$ 0,6	55,0



Встановлено, що культури фітопатогенів *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *atrofaciens* слабо синтезують сурфактанти. Високі поверхневі властивості відмічені у супернатанту КР *P. fluorescens*, поверхневий натяг якого становить 27 мН/м, а індекс емульгування дорівнює 50%, тоді як у фітопатогенних псевдомонад ці показники 50–54 мН/м та 0,8–1,3 %. Отже, в результаті широкого скринінгу серед штамів-мікроорганізмів різних видів роду *Pseudomonas* за критеріями ПН та індексу емульгування СКР обрано 3 активні продуценти ПАР – *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1 та *Pseudomonas* sp. PS-17, основними ПАР у яких є рамноліпіди.

На рисунку 3.1 представлені тонкошарові хроматограми ліпідних ПАР обраних штамів *Pseudomonas*.



**Рис.3.1. ТШХ ліпідів:** *Pseudomonas* sp. PS-17 (1), *P. fluorescens* 8573 (2), *P. aureofaciens* NB-1(3)

### 3.2. Використання економічно вигідних субстратів для синтезу ПАР штамами *Pseudomonas*

Тип джерела вуглецю для мікробного синтезу ПАР та його кількість може значно впливати на собівартість продукції: вартість сировини переважно складає 10-30% від загальної вартості виробництва. Отже, щоб зменшити ці витрати бажано використовувати недорогі субстрати для виробництва біоПАР. Спектр економічно вигідної сировини включає дешеві рослинні олії, відходи нафтової промисловості, молочно-кислого, спиртового виробництв, агропромислового комплексу. Так, серед рослинних олій заслуговують на увагу кокосова і кукурудзяна [204], достатньо дешеві соняшникова, ріпакова та соєва олії [205, 206]. Використовують й різні відпрацьовані олії (відходи смаження тощо), а також відходи рафінування олій [207]. Отже, низка різноманітних відходів промисловості і сільського господарства мають значний потенціал як субстрати для вирощування мікроорганізмів і виробництва біосурфактантів.

**Соєва олія.** Вивчено ефективність використання соєвої олії для отримання біоПАР. Досліджено синтез ПАР штамів роду *Pseudomonas*, а саме, *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1, *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах з соєвою олією та гліцерином як джерелами вуглецю. Отримано продукти біосинтезу– супернатант культуральної рідини (СКР), загальні ліпіди, рамноліпідний біокомплекс (РБК) та надосадову рідину після його осадження (НОР) (табл.3.2). При культивуванні штаму *P. fluorescens* 8573 спостерігалось збільшення біомаси, виходу РБК і ліпідів на соєвій олії у порівнянні з гліцерином та сумішшю субстратів. Проте, індекс емульгування на олії становить 40%, тоді як на гліцерині і суміші – 58-60%. При культивуванні штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на соєвій олії зростає біомаса, вихід РБК та ліпідів в порівнянні з гліцерином та сумішшю субстратів, проте індекс емульгування знижується від 60% на гліцерині та суміші до 45% на олії. Це може свідчити про те, що якісний склад ліпідів

змінюється. Тобто, для синтезу ПАР даним штамом краще використовувати гліцерин або суміш соєвої олії з гліцерином.

Таблиця 3.2.

**Синтез ПАР штамми *Pseudomonas* на соєвій олії, гліцерині та їх суміші**

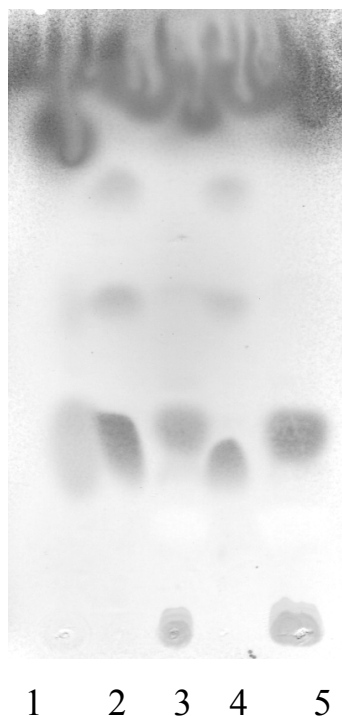
Штам	Джерело вуглецю, 4%	АСБ, г/дм <sup>3</sup>	ПАР, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Поверхневий натяг, мН/м	E <sub>24</sub> , %
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	Соєва олія	3,9±0,3	8,2±0,4	9,8±0,3	29,5±0,5	45,8±0,4
	Соєва олія+ гліцерин (1:3)	3,6±0,2	7,7±0,4	7,0±0,3	29,0±0,5	60,1±0,8
	гліцерин	3,3±0,2	5,5±0,3	5,1±0,4	29,0±0,5	60,6±0,5
<i>P. fluorescens</i> 8573	Соєва олія	3,1±0,2	9,4±0,3	10,5±0,4*	28,5±0,5	40,5±0,5
	Соєва олія+ гліцерин (1:3)	4,9±0,4	8,4±0,3	7,6±0,3	28,5±0,5	58,2±0,6
	гліцерин	2,9±0,3	5,3±0,2	5,2±0,4	28,5±0,5	60,2±0,8
<i>P. aureofaciens</i> NB-1	Соєва олія	3,9±0,3	6,8±0,3	-	39,0±0,5	2,5±0,5
	Соєва олія+ гліцерин (1:3)	3,8±0,2	5,4±0,3	-	31,0±0,5	6,5±0,5
	гліцерин	3,3±0,2	3,1±0,2	-	26,5±0,5	50,0±0,8

Примітки: АСБ - абсолютно суха біомаса; РБК-рамноліпідний біокомплекс; E<sub>24</sub>-індекс емульгування, - — не осаджується, \*результати достовірні за  $p \leq 0,05$

Проаналізовано надосадові рідини після осадження комплексів штамів *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas* sp. PS-17, показано, що в НОР залишається близько 2-8 г/дм<sup>3</sup> ліпідів в залежності від вибраного для культивування джерела вуглецю. Тобто, для виділення рамноліпідів із СКР цих штамів доцільно використовувати кислотне осадження, отримавши концентрат – біокомплекс, а надосадову рідину після її нейтралізації або розведення водою можна використовувати у рослинництві чи інших галузях, де не потрібна висока концентрація і ступінь чистоти ПАР. Отже,

можна досягнути практично безвідходного виробництва – усі компоненти постферментаційної культуральної рідини використовуються, оминається стадія екстракції розчинниками, що впливає на ціну біоПАР та екологічність процесу. Отримано та проаналізовано продукт біосинтезу *P. aureofaciens* NB-1 – СКР. Визначено його фізико-хімічні властивості (табл.3.2). Показано, що найбільша кількість ПАР синтезується при культивуванні штаму на середовищі з гліцерином, про що свідчить поверхневий натяг СКР – 29 мН/м) та високий індекс емульгування – 50%. Підвищення виходів ліпідів на суміші субстратів і соєвій олії пов'язані, ймовірно, із неповним засвоєнням гідрофобного субстрату (за даними ТШХ). Тобто найбільш вдалим джерелом вуглецю є гліцерин.

Отримані ПАР проаналізовано методом тонкошарової хроматографії (рис. 3.2), як рухому фазу використано суміш розчинників хлороформ-метанол-вода (65:15:4), а для візуалізації ліпідів – розчин фосфорномолібденової кислоти.



**Рис. 3.2. ТШХ загальних ліпідів:** СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1 (1), *Pseudomonas* sp. PS-17(2), НОР *Pseudomonas* sp. PS-17 (3) *P. fluorescens* 8573 (4) та НОР *P. fluorescens* 8573 (5)

Отже, встановлено, що досліджені штами синтезують біоПАР, які ефективно знижують поверхневий натяг розчинів та емульгують гідрофобні речовини. Штами *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas* sp. PS-17 утилізують соєву олію як економічно вигідний субстрат.

Також встановлено здатність досліджених штамів до синтезу ПАР на середовищах з відходами виробництва біодизелю (гліцеринова фракція, технічний гліцерин (ТГ) як джерелом вуглецю. В останні роки у зв'язку і погіршенням екологічної ситуації різко зростає інтерес до використання альтернативних джерел палива, отриманих з рослинної сировини, таких як біодизельне паливо. Сировиною для його виробництва є різноманітні рослинні та тваринні жири, які у процесі виробництва гідролізують до гліцерину і жирних кислот (ЖК), а потім етерифікують до метилових естерів, які власне і використовують як біодизельне паливо. Побічними продуктами є технічний гліцерин (70-80% водний розчин), залишки олії і вільних ЖК. Проблема утилізації таких відходів є важливою: на кожен тонну біодизелю накопичується 100 кг ТГ [208]. Ведуться інтенсивні пошуки можливостей його переробки, зокрема є дані й про використання ТГ як джерела вуглецю для синтезу біогенних ПАР. Досліджено здатність штамів *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1, *Pseudomonas* sp. PS-17 до синтезу ПАР на середовищах з гліцериною фракцією виробництва біодизелю та гліцерином як субстратами (табл. 3.3). Отже, при культивуванні досліджених штамів на технічному гліцерині біомаса є більшою на 11-20%, порівняно з середовищем із гліцерином. Такий результат одержано при вирощуванні продуцентів на змішаних субстратах, у даному випадку – гліцерин та ріпакова олія, з яких складається гліцеринова фракція біодизелю.

Таблиця 3.3.

**Синтез біоПАР штамами *Pseudomonas* на мінеральному середовищі з гліцерином і технічним гліцерином (ТГ) як джерелами вуглецю**

Штам	Субстрат (4% мас.)	АСБ, г/дм <sup>3</sup>	E <sub>24</sub> , %		ПАР, г/дм <sup>3</sup>	Поверхневий натяг, σ, мН/м
			Вазелінова олива	Соняшникова олія		
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	гліцерин	3,5±0,2	20,0±0,5	40,5±0,5	5,5±0,3	30,5±0,5
	ТГ	3,9±0,3	12,5±0,5	25,5±0,5	5,9±0,4	32,3±0,7
<i>P. fluorescens</i> 8573	гліцерин	2,9±0,2	54,5±0,5	54,0±0,4	5,3±0,4	28,5±0,5
	ТГ	6,5±0,4	19,6±0,4	42,2±0,4	14,3±0,9*	34,4±0,4
<i>P. aureofaciens</i> NB-1	гліцерин	3,3±0,3	20,5±0,5	16,3±0,5	3,1±0,2	26,5±0,5
	ТГ	4,3±0,2	0,5±0,5	11,6±0,7	12,9±0,5	32,6±0,6

Примітки: АСБ- абсолютно суха біомаса; E<sub>24</sub>-індекс емульгування; ТГ- технічний гліцерин; \*результати достовірні за  $p \leq 0,05$

Також залишки вітамінів, мікроелементів та фосфоліпідів можуть інтенсифікувати ріст бактерій. Проте, ТГ засвоювався не повністю – візуально в об'ємі КР помічено емульсію водонерозчинного субстрату. Зафіксовано збільшення кількості загальних ліпідів, проте якісний аналіз методом ТШХ показав, що у складі ліпідів (окрім *Pseudomonas* sp. PS-17) переважають ЖК, що й впливає на підвищення поверхневого натягу СКР, отриманих на технічному гліцерині. Емульгувальна активність СКР, отриманих на ТГ, щодо вазелінової оливи в середньому в 2 рази нижча, ніж у контролі (середовище з гліцерином) та в 1,5 рази нижча при емульгуванні соняшникової олії.

Для подальших експериментів обрано штам *Pseudomonas* sp. PS-17 та досліджено його ріст на ТГ як джерелі вуглецю (у концентраціях 2-10% мас) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

**Синтез ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на мінеральному середовищі  
з технічним гліцериним**

ТГ, %	Біомаса, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Е <sub>24</sub> , %		Жирні кислоти, г/дм <sup>3</sup>	σ, мН/м
			Вазелінова олива	Соняшникова олія		
2	2,4	5,6	18	35	4,2	29
3	3,3	5,7	15	29	4,2	29
4	3,9	7,4	12	25	5,8	30
5	4,3	9,5	9	14	8,1	31
10	5,8	30,1	5	10	28,8	32

При збільшенні концентрації ТГ зростають біомаса, вміст ліпідів та РБК. Проте із збільшенням концентрації ТГ у складі СКР та РБК відмічено збільшення кількості ЖК (синтезованих або залишків із субстрату), тобто при збільшенні кількості ТГ субстрат не повністю утилізується, що впливає на властивості СКР – зростає поверхневий натяг, знижується емульгувальна активність. Тому, для отримання ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 можна рекомендувати ТГ як джерело вуглецю у концентраціях до 4%.

Досліджено емульгувальну активність та стабільність емульсій на основі водного розчину РБК (0,5-5 г/дм<sup>3</sup>), виділеного з СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, що культивувався на середовищі з 4 % ТГ. В якості модельних вуглеводнів використано вазелінову оливу та соняшкову олію. Стійкість емульсій аналізували через 1 (Е<sub>24</sub> год), 6 (Е<sub>144</sub> год) та 21 (Е<sub>504</sub> год) добу (табл. 3.5). Як виявилось, РБК ефективно емульгує обидві гідрофобні речовини, при чому із збільшенням його концентрації показники емульгування соняшникової олії підвищуються, а вазелінової оливи – зменшуються. Це можна пояснити більшою спорідненістю РБК, отриманого на ТГ, до рослинних олій, і здатністю до їх емульгування, емульсії РБК (5 г/дм<sup>3</sup>) з соняшниковою олією є стабільнішими в часі (Е<sub>504</sub> – 36%).

Таблиця 3.5.

**Емульгувальні властивості рамноліпідного біокомплексу *Pseudomonas* sp. PS-17, отриманого на середовищі з технічним гліцерином (4 %)**

РБК, г/ дм <sup>3</sup>	Гідрофобні речовини	E <sub>24</sub> , %	E <sub>144</sub> , %	E <sub>504</sub> , %
0,5	Соняшникова олія	43	33	13
	Вазелінова олива	37	22	5
2,5	Соняшникова олія	45	29	13
	Вазелінова олива	32	18	3
5	Соняшникова олія	54	54	36
	Вазелінова олива	31	18	3

Тобто, рамноліпідний біокомплекс штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, отриманий на середовищі з 4% ТГ можна використовувати як ефективний емульгатор, а також для біодеградації відходів олійної промисловості.

Отже, бактеріальні штами *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1 та *Pseudomonas* sp. PS-17 здатні утилізувати відходи виробництва біодизелю. Штам *Pseudomonas* sp. PS-17 синтезує ПАР на відходах виробництва біодизелю (технічному гліцерині) за концентрацій до 10%. Отриманий на ТГ рамноліпідний біокомплекс є ефективним емульгатором гідрофобних речовин.

### **3.3. Оптимізація поживних середовищ та підбір джерел вуглецю для культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17**

#### **3.3.1. Розробка оптимального складу ферментаційного та інокуляційного середовищ для синтезу біоПАР**

Експерименти спрямовані на визначення оптимального складу двох поживних середовищ: інокуляційного – з високим виходом біомаси для посівного матеріалу та ферментаційного – з високим виходом продуктів.



Таблиця 3.6.

**Вихід продуктів синтезу *Pseudomonas* sp. PS-17 від вмісту гліцерину, натрій нітрату, натрій цитрату**

№	Склад поживного середовища, г/дм <sup>3</sup>			Біомаса, г/дм <sup>3</sup>				РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди, г/дм <sup>3</sup>	Рамно- ліпіди, г/дм <sup>3</sup>	Полісахариди, г/дм <sup>3</sup>	Емульгування, E <sub>24</sub> , %			CMD (120 год)	σ, мН/м
	Гліце- рин	NaNO <sub>3</sub>	цитрат Na	24 год.	48 год.	72 год.	120 год.					E <sub>24</sub>	E <sub>48</sub>	E <sub>168</sub>		
1	15	1	0	1,80	2,31	2,75	2,90	1,56	1,77	2,60	0,42	47	44	38	32	32,17
2	20	2	1	1,46	1,93	2,18	2,26	1,86	2,77	5,53	0,55	43	41	22	32	30,99
3	25	3	2	2,10	2,88	3,34	3,34	3,58	1,71	3,25	1,39	41	40	36	64	30,04
4	30	4	3	2,26	2,98	3,55	3,34	5,16	1,89	6,50	2,08	41	38	32	128	29,34
5	35	5	4	2,31	3,13	3,59	3,85	4,32	2,00	3,25	2,33	41	39	33	128	26,50
6	40	6	5	2,00	2,62	3,08	3,44	4,12	2,19	2,75	1,81	45	40	34	64	27,45
7	15	2	2	2,08	2,87	2,77	1,75	1,69	1,13	3,58	0,90	44	42	40	16	29,33
8	20	3	3	1,59	2,08	2,49	1,88	1,74	1,18	4,88	0,67	49	48	44	16	32,17
9	25	4	4	2,16	2,92	3,39	3,08	4,49	1,53	3,25	1,65	44	40	35	64	28,16
10	30	5	5	2,46	2,67	3,54	3,34	4,56	1,22	4,55	1,58	49	47	43	64	26,74
11	35	6	0	1,54	2,13	2,67	3,42	4,44	2,29	1,63	2,85	49	45	42	128	31,69
12	40	1	1	1,74	2,21	2,28	2,52	2,20	1,30	2,45	0,72	29	28	19	32	30,04
13	15	3	4	2,26	2,80	2,57	2,06	2,09	1,14	2,28	1,18	42	35	32	16	29,10
14	20	4	5	1,44	2,08	2,28	1,67	2,45	1,62	3,25	1,00	31	29	29	16	35,24
15	25	5	0	1,80	2,29	2,72	3,21	4,26	1,81	2,93	1,78	51	51	51	64	32,40
16	30	6	1	2,11	2,47	2,93	3,80	5,20	2,36	4,55	2,18	49	49	48	128	30,52
17	35	1	2	1,82	2,21	2,52	2,83	1,48	0,85	0,75	0,55	50	48	23	32	30,04
18	40	2	3	2,16	2,67	3,13	3,54	2,90	2,03	2,00	1,28	46	44	40	128	28,86
19	15	5	2	2,42	3,24	2,72	1,67	3,00	0,62	2,00	1,05	51	49	33	32	30,52
20	20	6	4	1,90	2,08	2,31	1,72	2,78	1,23	1,80	0,75	31	29	17	8	34,52
21	25	1	3	1,95	2,38	2,59	2,62	2,06	1,06	1,15	0,62	26	24	23	32	28,86
22	30	2	5	2,62	3,03	3,29	3,47	2,74	1,35	1,15	1,36	44	37	36	64	27,21
23	35	3	0	1,88	2,41	2,87	3,44	4,31	2,73	4,55	2,00	50	50	47	128	28,86
24	40	4	1	1,70	2,39	2,78	3,39	5,02	3,25	5,85	2,80	23	23	21	128	31,70

Основними компонентами середовища, що впливають на накопичення біомаси та продуктів синтезу, є джерела вуглецю та азоту. З попередніх робіт та літератури відомо, що натрій цитрат є стимулятором синтезу ПАР, тому його також використали в оптимізації. Тобто, підлягали оптимізації вміст гліцерину, натрій нітрату та натрій цитрату, дослідження проводили на шести рівнях. Як вихідні (цільові) параметри у процесі культивування контролювали вміст біомаси, рамноліпідів, РБК і полісахаридів (табл.3.6). Для оброблення дослідних результатів методом адитивно-решітчастих рівнянь і оптимізації синтезу обрано 24 співвідношення компонентів (із 216 ( $6^3$ ) варіантів). Обчислювали адитивно-решітчасті функції за кожним із компонентів. Із 24 дослідних варіантів вибрані середовища, оптимальні для одержання біомаси (1-а доба) в якості інокуляційного, а для РЛ, полісахаридів, РБК (5-а доба) – як ферментаційне середовище (табл. 3.7).

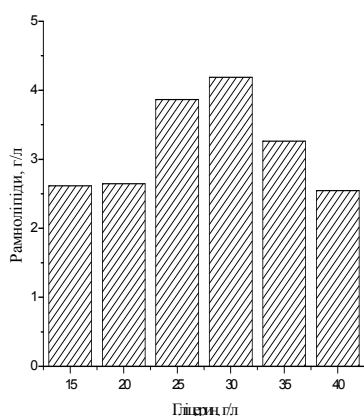
Таблиця 3.7.

**Склад поживних середовищ для штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, оптимізованих для отримання біомаси (1 доба) і цільових продуктів (5 доба)**

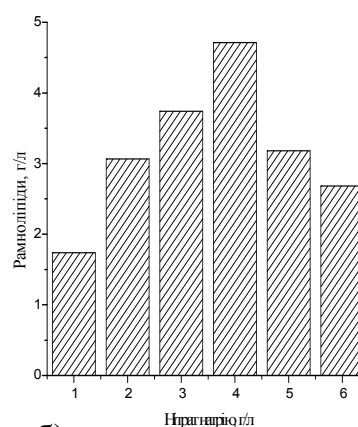
Цільовий продукт	Склад поживного середовища, г/дм <sup>3</sup>						Співвідношення C:N
	Гліцерин	NaNO <sub>3</sub>	Натрій цитрат	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	
Біомаса	30	5	5	2	1,2	0,5	14:1
Рамноліпідний біокомплекс	30	5	4	2	1,2	0,5	14:1
Ліпіди загальні	40	6	5	2	1,2	0,5	16:1
Рамноліпіди	30	4	4	2	1,2	0,5	18:1
Полісахариди	30	6	4	2	1,2	0,5	12:1

Підтвердження ефективності математично підібраних поживних середовищ (кількості гліцерину, натрій нітрату, натрій цитрату) для синтезу

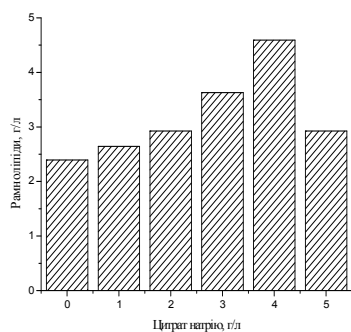
продуктів здійснювали експериментально, розширюючи діапазон їх концентрацій відносно оптимального. При культивуванні на середовищах оптимізованого складу показано збільшення виходу біомаси на 24%, а РЛ – на 77% (порівняно із вхідним середовищем). На рисунку 3.1. наведено залежності виходу рамноліпідів від концентрації у поживному середовищі гліцерину, натрій нітрату й цитрату.



а)



б)



в)

**Рис. 3.3. Вплив концентрації гліцерину (а), натрій нітрату (б) та натрій цитрату (в) у середовищі на вихід рамноліпідів.**

Отримані результати мають практичне значення, оскільки можуть бути рекомендовані для розробки технології промислового біотехнологічного виробництва поверхнево-активних рамноліпідів за двостадійним процесом.

### 3.3.2. Використання змішаних субстратів

Мікроорганізми здатні засвоювати широкий спектр джерел вуглецю – як гідрофільних, так і гідрофобних. Проте, на середовищах з моносубстратами не завжди вдається досягнути бажаного виходу продуктів. Досліджено синтез ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах з різними субстратами та їх сумішами: гексадекан з гліцерином, гексадекан з глюкозою, олія з гліцерином, етанол з глюкозою (табл. 3.8).

Таблиця 3.8.

#### Показники синтезу ПАР за умов росту *Pseudomonas* sp. PS-17 на моносубстратах і змішаних субстратах

Субстрат	АСБ, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	РЕ, г/дм <sup>3</sup>	Е <sub>24</sub> , %	ПН,σ, мН/м	Синтезуваль- на здатність, г РЕ/г АСБ
Гліцерин	3,5	5,1	4,1	55	28,4	1,17
Гексадекан (ГД)	1,8	2,2	0,7	50	31,2	0,38
Олія	1,8	4,8	3,05	56	29,3	1,25
Глюкоза	2,3	3,5	2,8	50	31,7	1,21
етанол	1,1	1,7	1,3	30	35,0	1,18
ГД+глюкоза (1:1)	3,2	2,8	3,5	44	31,2	1,10
Олія+гліцерин (1:2)	2,5	4,8	4,2	30	29,8	1,65
етанол+глюкоза (1:1)	1,5	1,6	0,5	32	39,7	0,33
ГД+гліцерин (1:2)	3,5	4,7	4,05	50	30,3	1,15
ГД+гліцерин (1:4)	3,0	5,9	3,3	45	30,3	1,10
ГД+гліцерин (1:6)	1,7	8,8	5,3	51	29,3	3,12

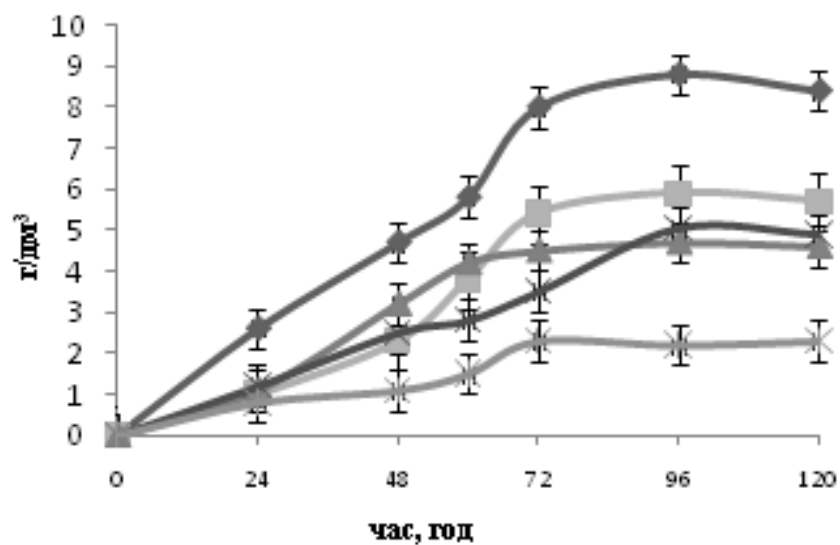
Синтезувальна здатність культури на середовищах з моносубстратами коливалася від 0,38 г/г при рості на гексадекані, до 1,25 г/г – на олії як джерелах

вуглецю, а при використанні дисубстратів – від 0,33 г/г (етанол з глюкозою) до 3,12 г/г (гексадекан з гліцерином 1:6), отже, середня продуктивність на середовищах із сумішами субстратів була у 1,4 рази вищою порівняно з відповідними моносубстратами. Найкращий ефект від застосування змішаних субстратів відмічено на поживних середовищах з гексадеканом і гліцерином. Так, при співвідношенні гексадекан – гліцерин 1:4 вміст рамноліпідного біокомплексу зростав у 1,16 разів порівняно з самим гліцерином та у 2,7 разів щодо гексадекану. При співвідношенні субстратів 1:6 кількість РБК збільшувалась у 1,74 рази у порівнянні з гліцерином та практично у 4 рази – з гексадеканом. На середовищах із дисубстратами гексадекан-глюкоза вміст рамноліпідів збільшувався в 1,25 разів порівняно з глюкозою та в у 5 разів – з гексадеканом, а при використанні гексадекану з гліцерином (1:6) цей показник зростав у 1,3 рази порівняно з гліцерином та у 7,5 разів – з гексадеканом. У інших варіантах експерименту із застосуванням дисубстратів ефект збільшення синтезу ПАР був відсутній (олія – гліцерин (1:2) та етанол – глюкоза (1:1)).

При культивуванні *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах із сумішами олії з гліцерином та етанолу з глюкозою кількості синтезованого РБК суттєво не змінювалися порівняно з моносубстратами; показники індексу емульгування супернатанту культуральної рідини практично у всіх варіантах були в межах 50%, окрім вирощених на етанолі та сумішах олії з гліцерином й етанолу з глюкозою. Ефективне зниження поверхневого натягу СКР відмічено у більшості варіантів, окрім етанолу та етанолу з глюкозою як джерел вуглецю.

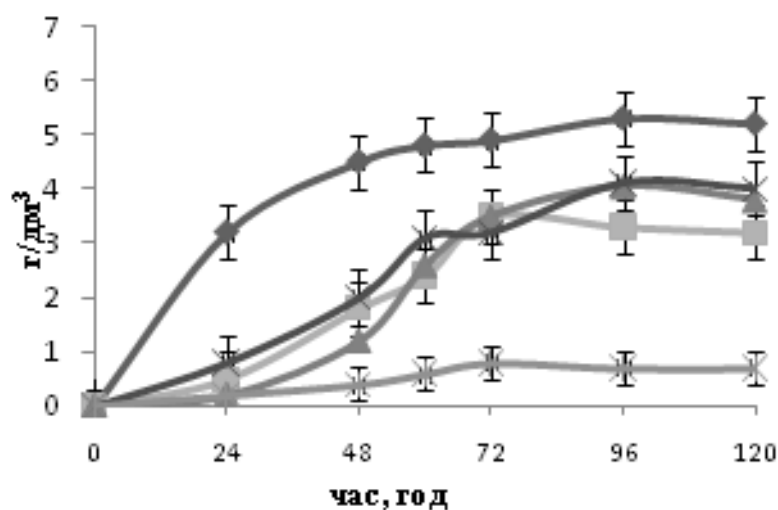
Це узгоджується з літературними даними про те, що ефективність синтезу ПАР на змішаних субстратах залежить не тільки від обраних джерел вуглецю, але й від їх співвідношення у середовищі росту [209]. Отже, застосування змішаних субстратів є перспективним підходом для інтенсифікації синтезу ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, причому найефективнішим є застосування сумішей гексадекану з гліцерином у співвідношенні 1:6.

Проаналізовано динаміку росту та синтезу ПАР *Pseudomonas* sp. PS-17 при вирощуванні на середовищах із сумішами гексадекану та гліцерину 1:2, 1:4 та 1:6 у порівнянні відповідними моносубстратами (рис. 3.8, 3.9). Як свідчать результати, показники синтезу рамноліпідного біокомплексу досягали максимуму через 96 год ферментації в усіх експериментальних варіантах (крім середовища з гексадеканом), причому на гексадекані з гліцерином (1:6) вміст синтезованого РБК був найбільшим і становив  $8,8 \text{ г/дм}^3$  (рис. 3.8).



**Рис.3.8.** Синтез РБК штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах з різними джерелами вуглецю (◆ – гексадекан та гліцерин 1:6, ■ - гексадекан та гліцерин 1:4, ▲ - гексадекан та гліцерин 1:2, ×- гліцерин, \* -гексадекан)

Показано, що синтез рамноліпідів (рис.3.9) розпочинався із лог-фази, найбільшу їх кількість (за показником рамноліпідного еквіваленту, РЕ) було відмічено на 4-у добу процесу культивування при використанні як гексадекану, так і гексадекану з гліцерином (1:6) – було отримано  $5,3 \text{ г/дм}^3$  рамноліпідів (за РЕ).

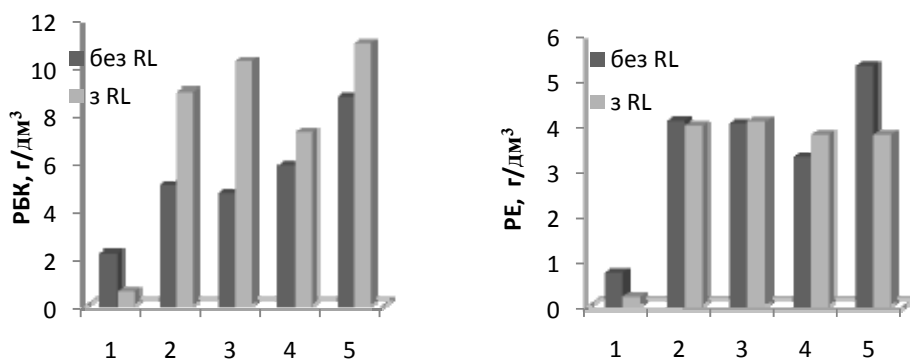


**Рис. 3.9. Синтез рамноліпідів за рамнозним еквівалентом (РЕ) штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищах з різними джерелами вуглецю**  
 (♦ – гексадекан та гліцерин у співвідношенні 1:6, ■ - гексадекан та гліцерин у співвідношенні 1:4, ▲ - гексадекан та гліцерин у співвідношенні 1:2, × - гліцерин, \* - гексадекан)

Наведені результати свідчать, що використання змішаних ростових субстратів є перспективним напрямком для розробки технології синтезу рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, причому найкращі показники отримано на суміші гексадекану з гліцерином (1:6). Технологічними й економічними перевагами такого підходу є скорочення тривалості процесу мікробного синтезу до 4 діб, високими показниками вмісту продуктів – 4,9 г/дм<sup>3</sup> рамнози (РЕ) та 8 г/дм<sup>3</sup> рамноліпідного біокомплексу.

Досліджено також ефективність додавання рамноліпідів та мінералу глауконіту у поживне середовище при культивуванні *Pseudomonas* sp. PS-17 на кількість ПАР, що представляє інтерес як з наукової, так і практичної точки зору для можливої стимуляції біосинтезу різних сполук. Попередньо було

визначено інгібувальну концентрацію РЛ на ріст дослідного штаму, оскільки відомо, що ПАР (у певних кількостях) мають протимікробні властивості. Показано, що РЛ у діапазоні концентрацій 0,001-1 г/л не інгібують ріст даного штаму, отже, їх було використано їх концентрації 0,1 і 0,05 г/л, а як джерела вуглецю застосовано гексадекан, гліцерин, суміш гексадекану з гліцерином (1:6, 1:4, 1:2). Визначено, що для культури *Pseudomonas* sp. PS-17 показники синтезу ПАР практично не залежать від кількості доданих РЛ. Індеси емульгування у всіх варіантах, крім гексадекану з РЛ, коливались в межах 38-55%. Збільшення кількості ПАР при додаванні РЛ у 1,15 рази зафіксовано на середовищі з гексадеканом і гліцерином 1:4, проте вміст РБК підвищувалася у 1,8-2,5 рази майже у всіх варіантах з додаванням РЛ, окрім середовища з гексадеканом (рис. 3.10).



**Рис.3.10. Вплив рамноліпідів на синтез РБК (а) та рамноліпідів (за РЕ) (б)** (1 – середовище з гексадеканом, 2 – з гліцерином, 3 – гексадекан і гліцерин 1:2, 4 – гексадекан і гліцерин 1:4, 5 – гексадекан і гліцерин 1:6

Показано, що додавання РЛ ефективно стимулювало синтез рамноліпідного біокомплексу, особливо при культивуванні *Pseudomonas* sp. PS-17 на середовищі з гексадеканом і гліцерином (1:6) з внесенням РЛ (0,05 г/дм³) у середовище – одержано 12,1 г/дм³ РБК (табл. 3.9).



Таблиця 3.9.

**Вплив рамноліпідів та глауконіту на синтез поверхнево-активних продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17 на суміші гексадекану з гліцерином 1:6**

Варіант	Біомаса г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	РЕ, г/дм <sup>3</sup>	Індекс емуль- гування, Е <sub>24</sub> , %	ПН, σ, мН/м	ПАР- синтезувальна здатність, г РЕ/г біомаси
Контроль	1,7	8,80	5,30	51	29,3	3,12
+0,005% РЛ	2,0	12,10	4,18	46	33,5	2,10
+0,01% РЛ	2,7	10,30	3,50	45	32,6	1,30
+0,05% глауконіту	2,6	0,70	0,13	52	32,6	0,05
+0,005% РЛ+0,05% глауконіту	2,9	0,90	0,13	55	32,6	0,05
+0,01% РЛ+ 0,05% глауконіту	2,7	0,8	0,13	54	32,6	0,05

Ймовірно, що внесення РЛ на початку культивування продуцента сприяє підвищенню активності ферментної системи, кращому засвоєнню субстрату та активізує утворення РБК, а також рамноліпіди, можуть стимулювати ріст мікроорганізмів, збільшуючи біодоступність гідрофобних субстратів шляхом утворення міцел й транспорту їх у клітини [210]. Отже, встановлено ефективність застосування змішаних субстратів – гліцерину з гексадеканом 1:6 для інтенсифікації синтезу ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Доведено також можливість стимулювання мікробного синтезу рамноліпідного біокомплексу при додаванні рамноліпідів за концентрації 0,05 г/дм<sup>3</sup> у середовище росту при культивуванні даного штаму.

### 3.4. Розроблення та удосконалення способів виділення поверхнево-активних продуктів

#### 3.4.1. Використання методу багатопараметрових рівнянь для екстракції

##### ПАР штамів *Pseudomonas*

*Розробка оптимальних методів виділення рамноліпідних ПАР із рамноліпідного біокомплексу штаму Pseudomonas sp. PS-17.* Проведено оптимізацію процесів екстракції рамноліпідів *Pseudomonas sp. PS-17* із РБК. Визначено вихід та якісний склад ПАР в залежності від розчинника, використаного для екстракції: хлороформ, діетиловий ефір, бензол, чотирьох хлористий вуглець, гексан, етилацетат, циклогексанон, амілацетат, бутилацетат, дихлоретан, бутанол. Підбір оптимальних методів виділення є перспективним для ефективного отримання чистих продуктів для використання в медицині, біохімії. Кількість РЛ визначали гравіметрично після упарювання розчинника, також обчислювали масу рамноліпідів (Р), що переходять із водної фази в 1 моль екстрагенту. Дані наведено в таблиці 3.10.

Отримані дані опрацьовані методом багатопараметрових рівнянь, що дало можливість обрати оптимальні екстрагенти та спрогнозувати ефективність інших, недосліджених розчинників. Узагальнення табличних даних приводить до 6-параметрового рівняння 3.1.

$$\lg P = -1,349 + (4,054 \pm 0,98)f(n^2) + (0,514 \pm 0,32)f(\varepsilon) + (0,923 \pm 0,205) \cdot 10^{-3} B - (6,341 \pm 9,534) \cdot 10^{-3} E_T + (0,152 \pm 0,508) \cdot 10^{-3} \delta^2 + (4,257 \pm 0,748) \cdot 10^{-3} V_M \quad (3.1)$$

Доволі висока величина множинного коефіцієнта кореляції  $R = 0,959$  вказує на адекватність одержаного рівняння; його середнє квадратичне відхилення  $s \pm 0,039$ .

Таблиця 3.10.

**Кількісний вихід ПАР з рамноліпідного біокомплексу в залежності від  
використаного екстрагента**

Екстрагент	Кількісний вихід рамноліпідів, %	$P_{\text{експер}}$	$\lg P_{\text{експер}}$	$\lg P_{\text{розрах}}$	$\Delta \lg P$
Хлороформ	49	1,37	0,1364	0,0729	-0,0635
Діетиловий ефір	43	1,56	0,1740	0,2158	0,0218
Бензол	57	1,78	0,2504	0,2228	-0,0276
Тетрахлорметан	33	1,22	0,0864	0,1387	0,0524
Гексан	26	1,15	0,0607	0,0656	0,0049
Етилацетат	46	1,58	0,1987	0,1383	-0,0604
Циклогексанон	71	2,86	0,4564	0,4387	-0,0176
Амілацетат	54	2,83	0,4518	0,4413	-0,0105
Бутилацетат	43	2,05	0,3118	0,3196	0,0078
Дихлоретан	42	1,17	0,0682	0,1216	0,0534
Бутанол	51	1,66	0,2201	0,2595	0,0394

Примітка:  $P$  – маса ліпідів, що переходять із водної фази в 1 моль екстрагенту.

Адекватність даного рівняння підтверджується його узгодженням з критерієм Фішера при степені надійності  $\alpha=0,95$ . Знаки при поодиноких членах рівняння вказують, що всі його члени, крім електрофільності, сприяють процесу переходу рамноліпідів органічну фазу. Знак „мінус” при члені  $E_t$  зрозумілий, оскільки екстрагують речовину з кислотною  $\text{COOH}$ -групою, тобто він вказує на здатність екстрагенту до електрофільної сольватації буде протидіяти переходу даної речовини в органічну фазу. Однак, дуже низькі значення парних коефіцієнтів кореляції  $\lg P$  з поодинокими членами рівняння  $r$  не дають можливості визначити вклад поодиноких членів рівняння в сумарний

сольватаційний ефект. Відносно найбільше значення  $r = 0,67$  спостерігається із основністю екстрагенту В, що зрозуміло, враховуючи кислий характер комплексу (екстрагованої речовини). Великі значення стандартних відхилень при більшості коефіцієнтів рівняння, що в деяких випадках перевищують їх абсолютні значення ( $\delta^2$ , Ет), дозволяють припустити, що вплив ряду членів буде незначним. Тому значення поодиноких членів перевіряли згідно з рекомендаціями групи по кореляційному аналізу в хімії при IUPAC шляхом почергового виключення поодиноких членів з визначенням величини R одержуваних рівнянь з меншим числом членів. Отже, встановлено незначимість параметрів  $\delta^2$  та Ет ; при їх виключенні одержано 4-параметрове рівняння (3.2) з майже незмінним значенням R.

$$\lg P = -1,519 + (4,271 \pm 0,685)f(n^2) + (0,29 \pm 0,205)f(\epsilon) + (0,969 \pm 0,197) \cdot 10^{-3}B + (4,236 \pm 0,724) \cdot 10^{-3}V_M \quad (3.2)$$

$$R=0,956 \text{ та } s \pm 0,041$$

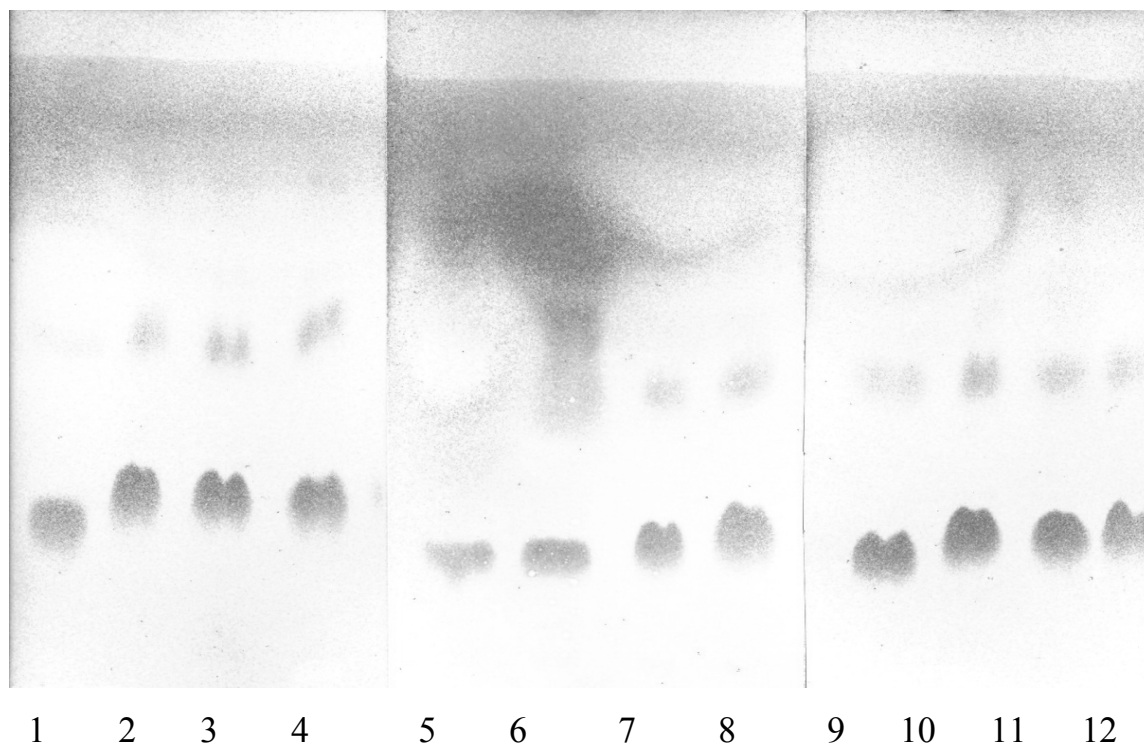
Величини обчислених за даним рівнянням теоретичних значень величини  $\lg P$  та їх відхилень від експерименту  $\Delta \lg P$  також наведено в таблиці. Для більшості екстрагентів ці відхилення знаходяться в границях коридору похибок  $s \pm 0,041$  і не перевищують границі  $\pm 2s$  (чотирьох хлористий вуглець 0,052; етилацетат 0,06; дихлоретан 0,053). Без суттєвого впливу можна виключити з обчислень також полярність. Множинний коефіцієнт кореляції стає  $R=0,95$  (рівняння 3.3).

$$\lg P = -1,409 + (4,328 \pm 0,75)f(n^2) + (1,165 \pm 0,154) \cdot 10^{-3}B + (3,782 \pm 0,711) \cdot 10^{-3}V \quad (3.3)$$

$$R=0,947 \text{ та } s \pm 0,0446$$

Однак, подальше виключення членів  $f(n^2)$  чи  $V_M$  практично руйнує кореляцію R одержаних 2-параметрових рівнянь ( $R=0,74-0,78$ ). Ще більше впливає виключення основності В згідно з кислим характером речовини, R знижується до 0,55, чим підтверджується вирішальний вплив кислотно-основної

взаємодії сполуки з екстрагентом. Встановлено, що найкращими екстрагентами із досліджуваного ряду є розчинники із основністю, підвищеною за рахунок наявності *n*-електронних пар в карбонільних групах – складні ефіри чи циклогексанон. Цікавим є те, що діетиловий ефір має тільки середню екстрагувальну здатність. Можливо, це пояснюється його низькою молекулярною масою, адже збільшення мольного об'єму, як показує рівняння (3.3) теж сприяє переходу речовини в органічну фазу. На ТШХ (рис. 3.11) наведено якісний склад ліпідів з РБК *Pseudomonas* sp. PS-17, екстрагованих різними розчинниками у полярній системі хлороформ:метанол:вода 65:15:2 за візуалізації фосфорно-молібденовою кислотою.



**Рис. 3.11.** Тонкошарова хроматограма ліпідних екстрактів з рамноліпідного біокомплексу *Pseudomonas* sp. PS-17 при екстракції різними розчинниками: 1 - бутанол, 2 - тетрахлорметан, 3 - хлороформ, 4 - гексан, 5 - циклогексанол, 6 - циклогексанон, 7 - бутилацетат, 8 - етилацетат, 9 - амілацетат, 10 - дихлоретан, 11 - бензол, 12 - діетиловий ефір.

Можна прогнозувати, що найкращими екстрагентами будуть вищі триалкіламіни із високою основністю (наприклад трибутиламін, хінолін).

**Розробка оптимальних методів виділення ПАР із супернатантів культуральних рідин штаму *P. aureofaciens* NB-1.** Аналогічні розрахунки проведені щодо узагальнення даних по екстракції ліпідів із СКР *P. aureofaciens* NB-1 13 органічними розчинниками (табл. 3.12). Одержано шестипараметрове рівняння з відносно низьким коефіцієнтом множинної кореляції  $R = 0.8735$  і тільки після виключення даних для етилацетату (згідно Рекомендацій ІЮПАК проведено почергове виключення даних, які найбільше відхиляються і в кожному окремому випадку визначаємо множинний коефіцієнт кореляції) одержуємо адекватне рівняння (3.4) з  $R = 0.9725$

$$P = -0.1717 + (0.0842 \pm 0.2128)f(n^2) + (0.0707 \pm 0.1680)f(\epsilon) + (0.0001 \pm 0.0000)V + (0.0013 \pm 0.0050)E_T + (0.0001 \pm 0.0002)\delta^2 + (0.0006 \pm 0.0001)V_M \quad (3.4)$$

$$N = 12; R = 0.9725; S = \pm 0.00071$$

Слід звернути увагу на позитивний знак при електрофільності, що свідчить про можливу електрофільну сольватацію карбонільного кисню рамноліпіда. Також результати аналізів показують, що екстракція спиртами характеризується більшими значеннями  $P$  в порівнянні з іншими розчинниками. Величини парних коефіцієнтів кореляції при окремих членах досить високі, а тому можливо оцінити вклад окремих членів рівняння. Проте, при деяких членах рівняння стандартні відхилення більші від абсолютних значень, очевидно в зв'язку із складністю біологічної системи. Тому для оцінки значимості окремих членів рівняння використовувалась вищезгадана методика ІЮПАК. Таким чином, встановлена незначимість параметра  $E_T$ , величина  $R$  отриманого рівняння (3.5) дорівнює 0.9723:

$$P = -0.1427 + (0.0410 \pm 0.1384)f(n^2) + (0.1125 \pm 0.0612)f(\epsilon) + (0.0001 \pm 0.0000)B + (0.0001 \pm 0.0000)\delta^2 + (0.0007 \pm 0.0001)V_m \quad (3.5)$$

$$N = 12; R = 0.9723; S = \pm 0.0072.$$

Відносно низька значимість і поляризованості, після виключення цього члена отримуємо чотирипараметрове рівняння (3.6):

$$P = -0.1300 + (0.1059 \pm 0.0572)f(\epsilon) + (0.0001 \pm 0.0000)B + (0.0002 \pm 0.0000)\delta^2 + (0.0007 \pm 0.0001)V_m \quad (3.6)$$

$$N = 12; R = 0.9721; S = \pm 0.0072$$

Незначно зменшується множинний коефіцієнт кореляції і при виключенні полярності і при цьому отримуємо трипараметрове рівняння (3.7):

$$P = -0.1182 + (0.0001 \pm 0.0000)B + (0.0002 \pm 0.0000)\delta^2 + (0.0006 \pm 0.0001)V_m \quad (3.7)$$

$$N = 12; R = 0.9632; S = \pm 0.0082.$$

В результаті проведеного аналізу можна зробити висновок про те, що на екстракцію ліпідів із СКР *P. aureofaciens* NB-1 впливає основність, енергія когезії середовища і мольний об'єм.

**Розробка оптимальних методів виділення ПАР із СКР штаму *P. fluorescens* 8573.** Такі ж розрахунки проведені для екстракції ліпідів 13 органічними розчинниками із СКР штаму *P. fluorescens* 8573 (табл. 3.11). Узагальнення впливу розчинників на процес екстракції за допомогою шестипараметрового рівняння дало негативний результат, тобто множинний коефіцієнт кореляції менше 0.95, а саме  $R = 0.9178$ . Після виключення з розрахунків пентанолу – 2 отримуємо шестипараметрове рівняння (3.8) з  $R$  рівним 0.9763.

$$P = -0.2214 - (0.4035 \pm 0.2750)f(n^2) - (0.4001 \pm 0.1937)f(\epsilon) + (0.0002 \pm 0.0001)V + (0.0084 \pm 0.0055)E_T + (0.0003 \pm 0.0002)\delta^2 + (0.0006 \pm 0.0002)V_M \quad (3.8)$$

$$N = 12; R = 0.9763; S = \pm 0.0131$$

Для оцінки значимості окремих членів рівняння, як і в попередньому випадку, використовували методику запропоновану ІЮПАК [211], яка полягає в почерговому виключенні окремих членів з кожноразовим визначенням множинного коефіцієнту кореляції для рівнянь з меншим числом членів. Якщо зниження  $R$  незначне, вплив виключеного члена вважається також незначним. Таким шляхом встановлено незначимість густини енергії когезії, при цьому отримуємо п'ятипараметрове рівняння (3.9):

$$P = -0.3399 - (0.2254 \pm 0.2438)f(n^2) - (0.5493 \pm 0.1556)f(\epsilon) + (0.0002 \pm 0.0001)V + (0.0145 \pm 0.0018)E_T + (0.0004 \pm 0.0002)V_M \quad (3.9)$$

$$N = 12; R = 0.9733; S = \pm 0.0140$$

Також малозначимим виявився і член рівняння, що відповідає поляризованості розчинників, при виключенні його із розрахунків, множинний коефіцієнт кореляції зменшується незначно, а відповідне рівняння (3.10) має вигляд:

$$P = -0.4062 - (0.4998 \pm 0.1517)f(\epsilon) + (0.0003 \pm 0.0001)V + (0.0140 \pm 0.0018)E_T + (0.0006 \pm 0.0002)V_M \quad (3.10)$$

$$N = 12; R = 0.9712; S = \pm 0.0145.$$

Слід відзначити, що виключення із розрахунків параметра мольного об'єму приводить до рівняння (3.11) з множинним коефіцієнтом не суттєво нижчим від рекомендованого значення  $R \geq 0.95$



$$P = -0.3084 - (0.5828 \pm 0.1974)f(\epsilon) + (0.0003 \pm 0.0001)B + (0.0135 \pm 0.0024)E_T \quad (3.11)$$

$$N = 12; R = 0.9489; S = \pm 0.0192.$$

В таблиці 3.11. приведені відповідні розраховані і експериментальні значення  $P$ , а також їх відхилення.

Таблиця 3.11.

**Кількісний вихід ПАР супернатанту культуральної рідини штамів  
*P. aureofaciens* NB-1 та *P. fluorescens* 8573 в залежності від використаного  
екстрагента**

Розчинник	<i>P. aureofaciens</i> NB-1			<i>P. fluorescens</i> 8573		
	$P_{\text{експ.}}$	$P_{\text{розра. за рівнянням (3.7)}}$	$\Delta P$	$P_{\text{експ.}}$	$P_{\text{розра. за рівнянням (3.11)}}$	$\Delta P$
Пентанол-2	0.0932	0.0791	-0.0141	0.0613	0.1333	0.0720
Діетиловий ефір	0.0265	0.0324	0.0059	0.0291	0.0434	0.0143
Октан	0.0239	0.0347	0.0108	0.0166	-0.0001	-0.0167
Бутилацетат	0.0552	0.0494	-0.0058	0.0667	0.0508	-0.0159
Бензол	0.0113	0.0156	0.0043	0.0098	0.0369	0.0271
Толуол	0.0151	0.0246	0.0095	0.0103	0.0292	0.0189
Бутанол	0.0788	0.0815	0.0027	0.1564	0.1772	0.0208
Тетрахлорметан	0.0136	0.0061	-0.0075	0.0097	-0.0015	-0.0112
Гексан	0.0153	0.0103	-0.0050	0.0171	0.0029	-0.0142
Амілацетат	0.0697	0.0640	-0.0057	0.0742	0.0574	-0.0168
<i>ізо</i> -Бутанол	0.0693	0.0795	0.0102	0.1845	0.1549	-0.0296
Етилацетат	0.2319	0.0362	-0.1957	0.0272	0.0346	0.0074
Хлороформ	0.0114	0.0061	-0.0053	0.0008	0.0167	0.0159

Примітка:  $P$  – маса ліпідів, що переходять із водної фази в 1 моль екстрагенту.

Як видно із розрахунків, на екстракцію біоПАР із супернатанту культуральної рідини штаму *P. fluorescens* 8573 впливають основність, електрофільність і полярність використаних розчинників.

Отже, узагальнено дані по екстракції ліпідів із СКР штамів бактерій *P. aureofaciens* NB-1 і *P. fluorescens* 8573 можуть бути адекватно узгоджені з властивостями органічних розчинників за допомогою багатопараметрових рівнянь лінійності вільних енергій. За допомогою розрахунків встановлено, що основною характеристикою розчинників, яка впливає на процес екстракції в обох випадках є основність. Кращими екстрагентами є спирти і естери, що можна пояснити сольватацією складноефірної групи (за допомогою водневих зв'язків). Можливо, такий вплив пояснюється і паралельним розташуванням алкільних ланцюгів спирту та  $\beta$ -оксидеканової кислоти молекули рамноліпиду. Результати проведених досліджень мають велике значення для правильного вибору оптимальних екстрагентів для одержання нових біотехнологічних продуктів.

Отже, вперше показано можливість застосування багатопараметрових рівнянь для узагальнення даних щодо екстракції біоПАР з рамноліпідного біокомплексу та з СКР штамів *Pseudomonas*. В усіх випадках отримували 3-параметрові рівняння, в яких основність розчинників відіграє важливу роль. Кращими екстрагентами ПАР є спирти та естери, за рахунок наявності *n*-електронних пар у карбонільних групах молекул рамноліпідів.

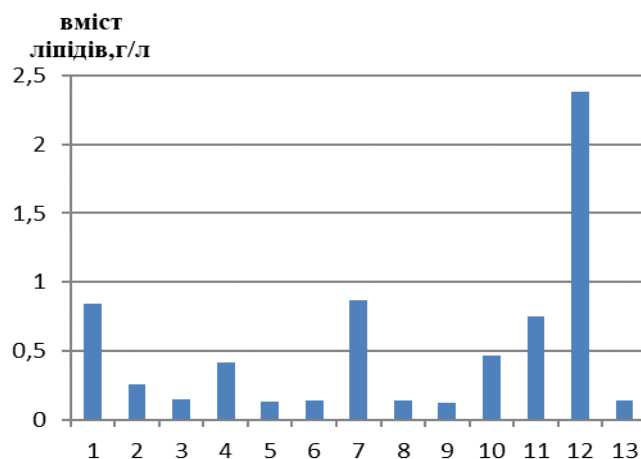
### **3.4.2. Виділення ПАР із супернатанту культуральної рідини штаму**

#### ***P. aureofaciens* NB-1**

Ліпіди, синтезовані штамом *P. aureofaciens* NB-1, доводиться виділяти з культуральної рідини – первинного продукту мікробного синтезу. За літературними даними, такі культури можуть продукувати рамноліпідні ПАР, проте їх виходи є низькими [212, 213]. Така ж проблема виникла у наших

дослідженнях – при низькому поверхневому натягу (до 26 мН/м) та високому показнику CMD (розведення СКР до збереження властивостей міцелоутворення) СКР нам не вдавалось досягти значних виходів ліпідів стандартними способами екстракції (екстракція сумішшю Фолча, хлористим метиленом, екстракцією з емульсії і т.д.)

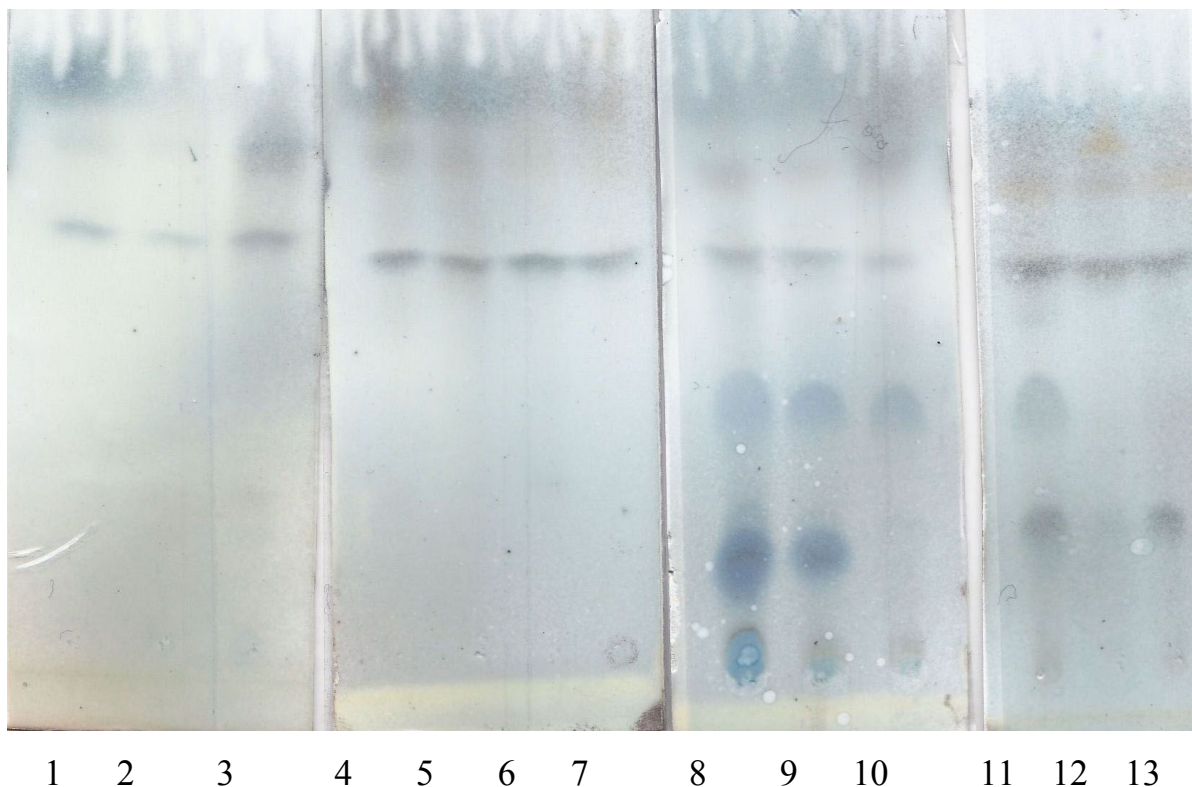
Тому було проведено експерименти з пошуку оптимального екстрагента з використанням розчинників різної природи: гексан, октан, бензол, толуол, бутанол, ізобутанол, пентанол, діетиловий ефір, етилацетат, бутилацетат, амілацетат, тетрахлорметан, хлороформ (рис. 3.12).



**Рис. 3.12. Виділення ліпідів з супернатанту культуральної рідини *P. aureofaciens* NB-1 різними розчинниками при рН 3: 1-пентанол, 2-діетиловий ефір, 3-октан, 4-бутилацетат, 5-бензол, 6-толуол, 7-бутанол, 8-тетрахлорметан, 9-гексан, 10-амілацетат, 11-ізобутанол, 12-етилацетат, 13-хлороформ.**

Показано, що при екстракції СКР етилацетатом вихід загальних ліпідів становить 2,38 г/дм<sup>3</sup>, при чому за екстракції гексаном, октаном, діетиловим ефіром, бензолом, толуолом, хлороформом, тетрахлоретаном екстрагуються переважно пігменти. Встановлено, що оптимальними екстрагентами є бутанол,

ізобутанол та етилацетат, про що свідчать як ТШХ (рис. 3.13.), так і гравіметричні дані.



**Рис. 3.13. Тонкошарова хроматограма ліпідних екстрактів біоПАР *P. aureofaciens* NB-1 виділених різними розчинниками при рН 3: 1-пентанол, 2-діетиловий ефір, 3-октан, 4-бутилацетат, 5-бензол, 6-толуол, 7-бутанол, 8-тетрахлорметан, 9-гексан, 10-амілацетат, 11-ізобутанол, 12-етилацетат, 13-хлороформ у полярній системі розчинників хлороформ:метанол:вода 65:15:2.**

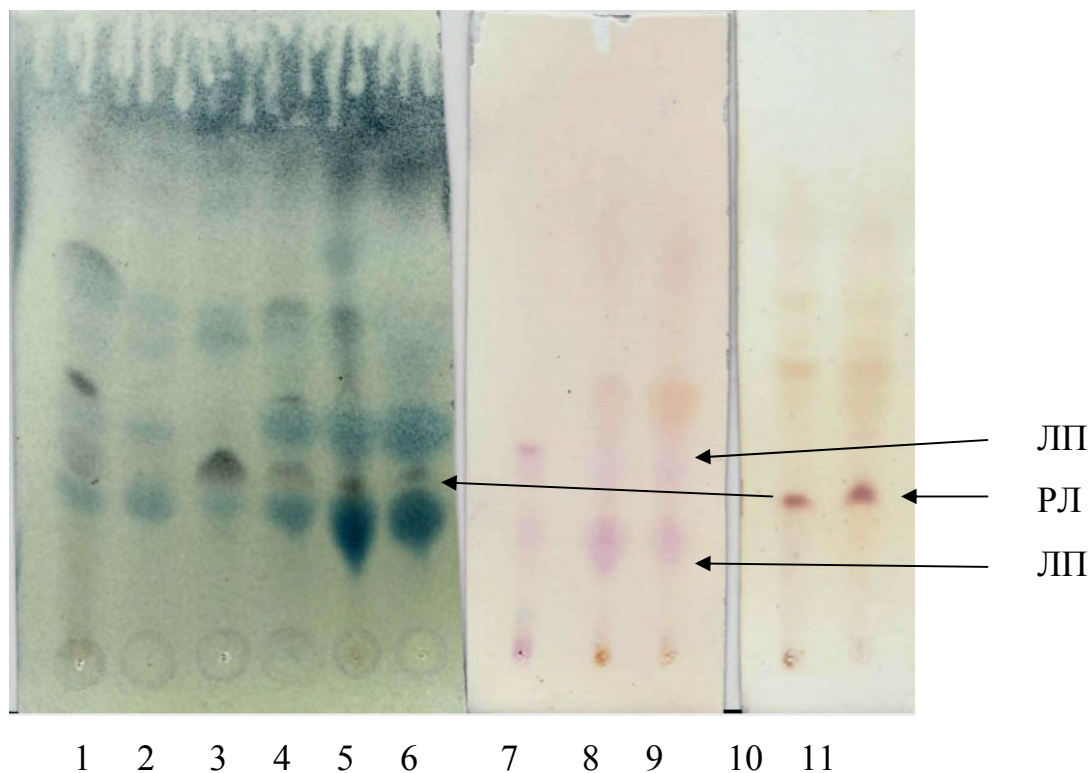
Далі визначали можливий вплив рН на екстракцію ПАР з СКР штаму *P. aureofaciens* NB-1 (рН 3, 8 та 11) (табл.3.12). Показано, що вихід ПАР найнижчий за рН 8, незалежно від екстрагента, а за рН 11 кількість ПАР, виділених етилацетатом з ізопропанолом (2:1) сягає 3,71 г/дм<sup>3</sup>. Тобто, доцільно використовувати екстрагенти на основі етилацетату при лужному рН.

Таблиця 3.12.

**Екстракція ліпідів із СКР штаму *P. aureofaciens* NB-1 за різних значень рН**

Розчинники	Загальні ліпіди, г/дм <sup>3</sup>		
	рН 3	рН 8	рН 11
Суміш Фолча	0,30±0,02	0,14±0,03	0,23±0,02
Етилацетат-ізопропанол (2:1)	2,41±0,05	1,05±0,03	3,71±0,05
Діетиловий ефір	0,21±0,03	0,11±0,02	0,22±0,03

Отримані екстракти проаналізовано методом ТШХ (рис. 3.14)



**Рис. 3.14.** ТШХ загальних ліпідів біоПАР *P. aureofaciens* NB-1, екстрагованих: 1, 2, 3 - суміш Фолча, рН 3, 7, 11 відповідно; 4, 5, 6 – етилацетат з ізопропанолом, рН 3, 7, 11 відповідно; 7, 8, 9 – етилацетат з ізопропанолом, рН 3 (ФМК), 7, 11 відповідно (нінгідрин); 10, 11 - етилацетат з ізопропанолом, рН 7, 11 (орцин).

Дані ТШХ (рис.3.14) свідчать, що серед загальних ліпідів штаму *P. aureofaciens* NB-1 поряд з рамноліпідами РЛ (варіант 10,11), що ідентифікуються за допомогою орцинового реагенту, також синтезуються і ліпопептиди ЛП (варіант 7, 8, 9), котрі візуалізуються нінгідриновим реагентом.

Отже, вперше доведено, що штам *P. aureofaciens* NB-1 здатний синтезувати одночасно поверхнево-активні речовини двох типів – рамноліпіди та ліпопептиди.

### **3.4.3. Виділення поверхнево-активних комплексів штамів *Pseudomonas***

Дослідження дії різних кислот та температурних режимів на кількісний вихід біокомплексів, синтезованих штамами *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas* sp. PS-17. Супернатанти культуральної рідини штамів *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas* sp. PS-17 підкислювали до рН 2,5-4,0 різними кислотами, нагрівали або охолоджували, відстоювали і центрифугували, отримуючи надосадову рідину та концентрат рамноліпідів (РБК), результати досліджень наведені в табл.3.13.

Показано, що для обох досліджуваних культур при нагріванні підкисленого СКР збільшувався вихід комплексів на 2-28% в залежності від застосованої кислоти, причому максимальний вихід спостерігався для *Pseudomonas* sp. PS-17 – 6,6 г/дм<sup>3</sup>. Тобто, виділення рамноліпідів із СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 доцільно проводити шляхом осадження хлоридною кислотою, а при біосинтезі ліпідів штамом *P. fluorescens* 8573 – сульфатною кислотою з наступним нагріванням (вихід збільшувався на 21% і 20% відповідно). Перевагами цього способу є економія часу, за рахунок відсутності такого процедурного кроку, як охолодження підкисленого СКР.

Таблиця 3.13.

**Вплив різних кислот і температури на осадження ПАР штамів роду  
*Pseudomonas***

Кис- лота	pH	<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17				<i>P. fluorescens</i> 8573			
		4°C, 24 год		100°C, 25 хв		4°C, 24 год		100°C, 25 хв	
		РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди в НОР, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди в НОР, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди в НОР, г/дм <sup>3</sup>	РБК, г/дм <sup>3</sup>	Ліпіди в НОР, г/дм <sup>3</sup>
CH <sub>3</sub> - COOH	4,5	4,57	3,9	5,88	3,5	4,39	4,2	5,71	3,4
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3	5,39	4,6	6,20	3,9	5,68	4,8	5,79	3,7
HCl	3	5,44	4,6	6,59	3,3	5,11	4,4	6,13	3,5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	5,41	4,5	5,86	3,7	5,17	4,2	6,20	3,6
HNO <sub>3</sub>	3	5,32	4,8	6,39	3,1	5,54	4,6	5,63	3,9

#### 3.4.4. Виділення полігідроксиалканоатів з біомаси штамів роду *Pseudomonas*

Важливими поверхнево-активними речовинами, що синтезуються штамми *Pseudomonas* є полі-β-гідроксіалканові кислоти. Як і рамноліпіди, вони містять β-гідроксіалканові кислоти в якості основних компонентів. Полігідроксиалканоати (ПГА) – це біополімери, синтезовані мікроорганізмами у вигляді ліпідних включень для зберігання енергії в гранульованих формах у клітині. На практиці вони є конкурентоспроможними заміниками нафтохімічних пластмас в селективних застосуваннях через їх здатність до біологічного розкладання. Досліджено кількісне виділення ПГА трьома

способами – екстракція сухих клітин хлороформом, оброблення розчином натрій додецилсульфату або рамноліпідних ПАР (табл. 3.14).

Таблиця 3.14.

**Вихід ПГА з клітин бактерій роду *Pseudomonas*  
в залежності від способу виділення**

Штам	Вихід ПГА з біомаси, %		
	Хлороформ	Натрій додецилсульфат +NaClO	Рамноліпіди
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	0,6	0,7	0,6
<i>P. fluorescens</i> 8573	3,0	3,2	3,1
<i>P. aureofaciens</i> NB-1	9,1	9,5	8,9

Останній спосіб є привабливішим, завдяки застосуванню екологічно безпечних ПАР, що дає змогу потенційно мінімізувати або усунути необхідність використання органічних розчинників або синтетичних ПАР при впровадженні у промислове виробництво полігідроксиалкоаноатів.

### **Висновки до розділу 3**

У результаті широкого скринінгу серед 32 штамів мікроорганізмів різних видів роду *Pseudomonas* обрано 3 активні продуценти ПАР - *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1 та *Pseudomonas* sp. PS-17.

Підібрано оптимальні середовища для одержання біомаси (перша доба) в якості інокуляційного середовища та для рамноліпідів, полісахариду, РБК (п'ята доба) в якості ферментаційного для культивування *Pseudomonas* sp. PS-17.



Встановлено ефективність застосування змішаних субстратів – гліцерину з гексадеканом у співвідношенні 1:6 для інтенсифікації синтезу ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Доведено також можливість стимулювання мікробного синтезу рамноліпідного біокомплексу при додаванні у середовище росту при культивуванні даного штаму рамноліпідів за концентрації 0,05 г/дм<sup>3</sup>.

Штами *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1 і *Pseudomonas* sp. PS-17 синтезують біоПАР на соєвій олії і технічному гліцерині як економічно вигідних субстратах.

Вперше показано можливість застосування багатопараметрових рівнянь для узагальнення даних щодо екстракції ліпідів з рамноліпідного біокомплексу та супернатанту культуральної рідини штамів *Pseudomonas*. В усіх випадках отримно 3-параметрові рівняння, в яких основність розчинників відіграє важливу роль. Кращими екстрагентами ПАР є спирти та естери, за рахунок наявності *n*-електронних пар в карбонільних групах молекул рамноліпідів.

Вперше доведено, що штам *P. aureofaciens* NB-1 здатний синтезувати одночасно поверхнево-активні речовини двох типів – рамноліпіди та ліпопептиди, а виділення таких ПАР доцільно здійснювати екстрагентами на основі етилацетату при лужному рН.

Виділення рамноліпідів із СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 доцільно проводити шляхом осадження хлоридною кислотою, штаму *P. fluorescens* 8573 – сульфатною кислотою з наступним нагріванням, при цьому вихід ПАР збільшувався на 21% та 20% відповідно.

#### **Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1.Єрохін В. А., Покинсьброда Т. Я., Карпенко О. В., Новіков В. П. Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом *Pseudomonas species* PS-17 – продуцента позаклітинних біосурфактантів. *Вісник Національного*

університету «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2006. № 553. С. 124-127

2.В. А. Єрохін, О. В. Карпенко, Т. Я. Покинсьброд, В. І. Лубенець. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов мікробного синтезу поверхнево-активних речовин. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2008. № 609. С. 135-140.

3.Покинсьброд Т.Я., Пирог Т.П., Карпенко О.В., Пристай М.В., Болібрех Л. Д. Синтез поверхнево-активних речовин штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на змішаних субстратах. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2016. № 841. С. 210-217.

4. Покинсьброд Т.Я., Карпенко О.В., Зінь І.М. Нові поверхнево-активні речовини штаму *Pseudomonas aureofaciens* NB-1. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 3(113). С. 71-76

5.Покинсьброд Т.Я., Карпенко О.В., Лубенець В. І., Мартинюк Н.Б., Зінь І.М. Біосинтез ПАР мікроорганізмами родів *Pseudomonas* на соєвій олії та дослідження їх властивостей. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування»*. 2017. № 868. С. 222-229.

6.Карпенко Е. В., Покинсьброд Т.Я., Макитра Р.Г., Пальчикова Е.Я. Оптимальные методы выделения биогенных поверхностно-активных рамнолипидов. *Журнал общей химии*. 2009. Т. 12. С. 2011-2014.

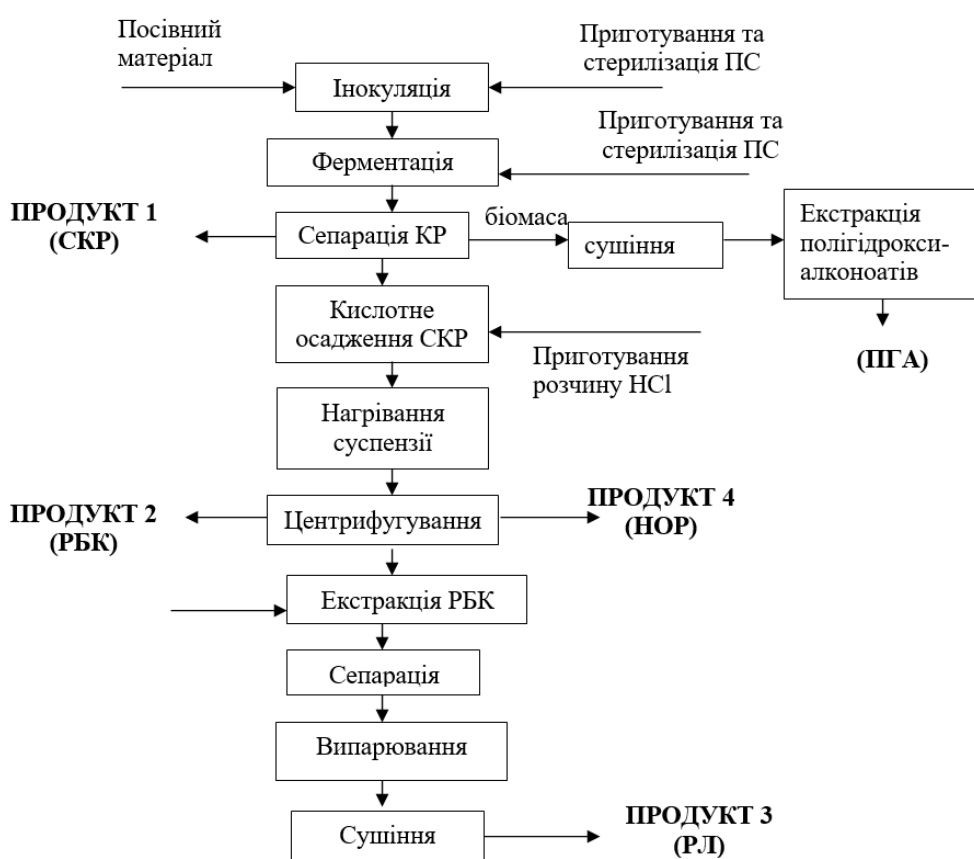
7.Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Ващенко Л. М., Покинсьброд Т. Я., Карпенко О. В. Синтез сурфактантів штамми *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Мікробіологічний журнал*. 2009. Т. 71. №3. С. 10 – 14

8.Патент України на винахід № 71792 А (Заявка № 20031212346), 15.12.2004 Поверхнево-активний біопрепарат. Карпенко О.В., Мартинюк Н.Б., Шульга О.М., Покинсьброд Т.Я., Вільданова-Марцишин Р.І., Щеглова Н.С., Бюлл.12.

## РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ПАР ШТАМУ *P. FLUORESCENS* 8573

### 4.1. Принципова технологічна й апаратурно-технологічна схеми процесу отримання продуктів *P. fluorescens* 8573

Проведені дослідження щодо культивування штаму на середовищі з соєвою олією та гліцерином стали основою створення технології промислового виробництва ПАР штаму *P. fluorescens* 8573. Запропоновано 5 форм цільових продуктів (рис.4.1): супернатант КР (1) та біоПАР (біокомплекс) (2), полігідроксиалконоат (3), надосадова рідина після сепарування біокомплексу (4), рамноліпіди (5).

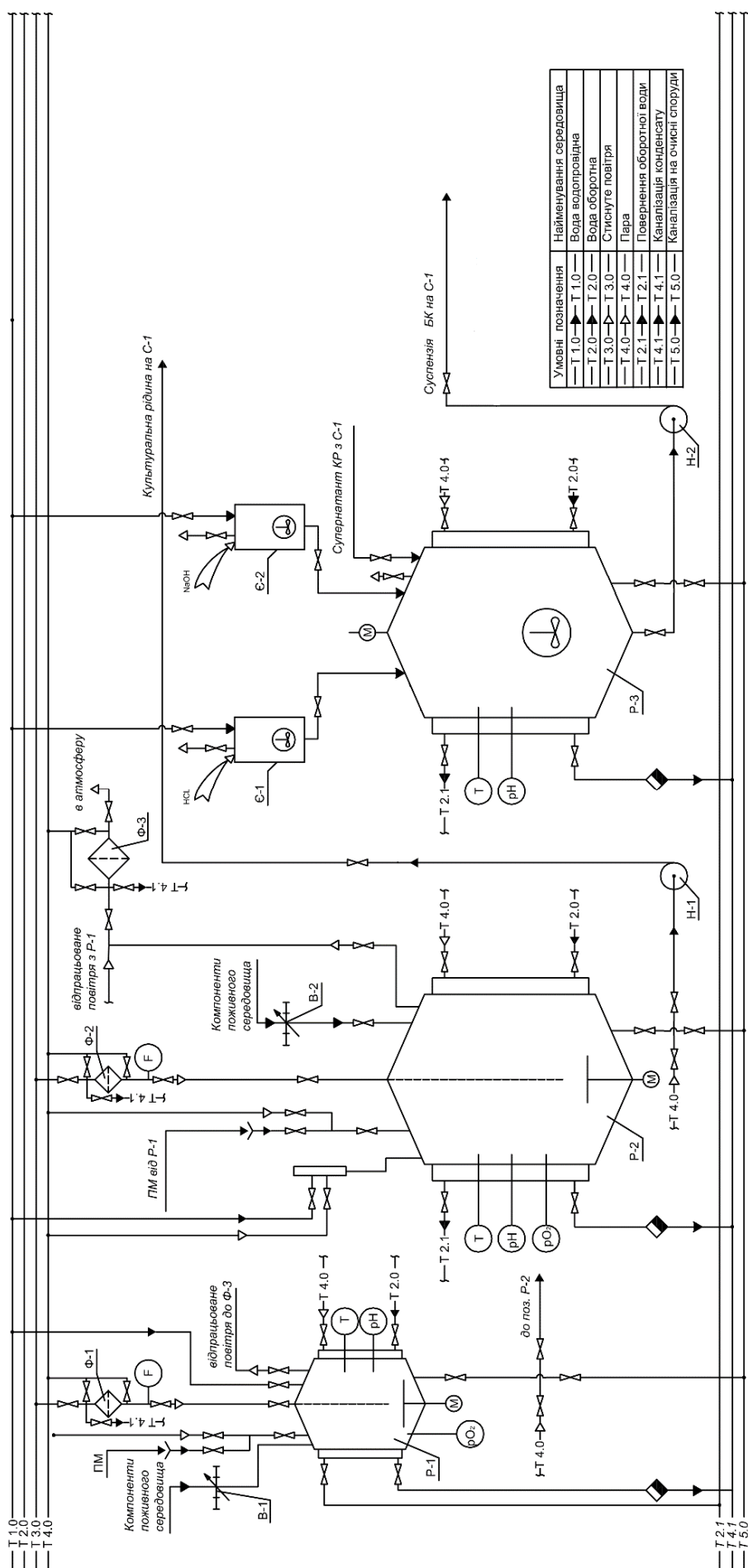


**Рис.4.1. Принципова блок-схема процесу отримання ПАР**

Для культивування продуцента використовують ферментер з вихровою системою аерації, який може бути модернізований на основі стандартного біореактора з нижньопривідною мішалкою [214, 215, 216, 217]. Такий підхід є ефективним у зв'язку з надмірним піноутворення КР у процесі культивування штаму-продуценту. За допомогою вихрової системи можна значно збільшити коефіцієнт масопереносу за киснем порівняно з реакторами інших систем аерації, тим самим зменшуючи витрати кисню, і як результат знизити загальні енерговитрати.

Технологія виробництва цільових продуктів *P. fluorescens* 8573 складається із допоміжних та основних робіт. Допоміжні роботи включають: санітарну підготовку виробництва (підготовка приміщень, обладнання, мийних, дезинфікувальних розчинів), підготовку стерильного технологічного повітря й поживного середовища. Основний технологічний процес (ТП) включає лабораторну та виробничу стадії отримання посівного матеріалу (ПМ), товарну ферментацію та стадії виділення продуктів [218].

Апаратурно-технологічну схему процесу отримання продуктів *P. fluorescens* 8573 подано на рис. 4.2; 4. 3.



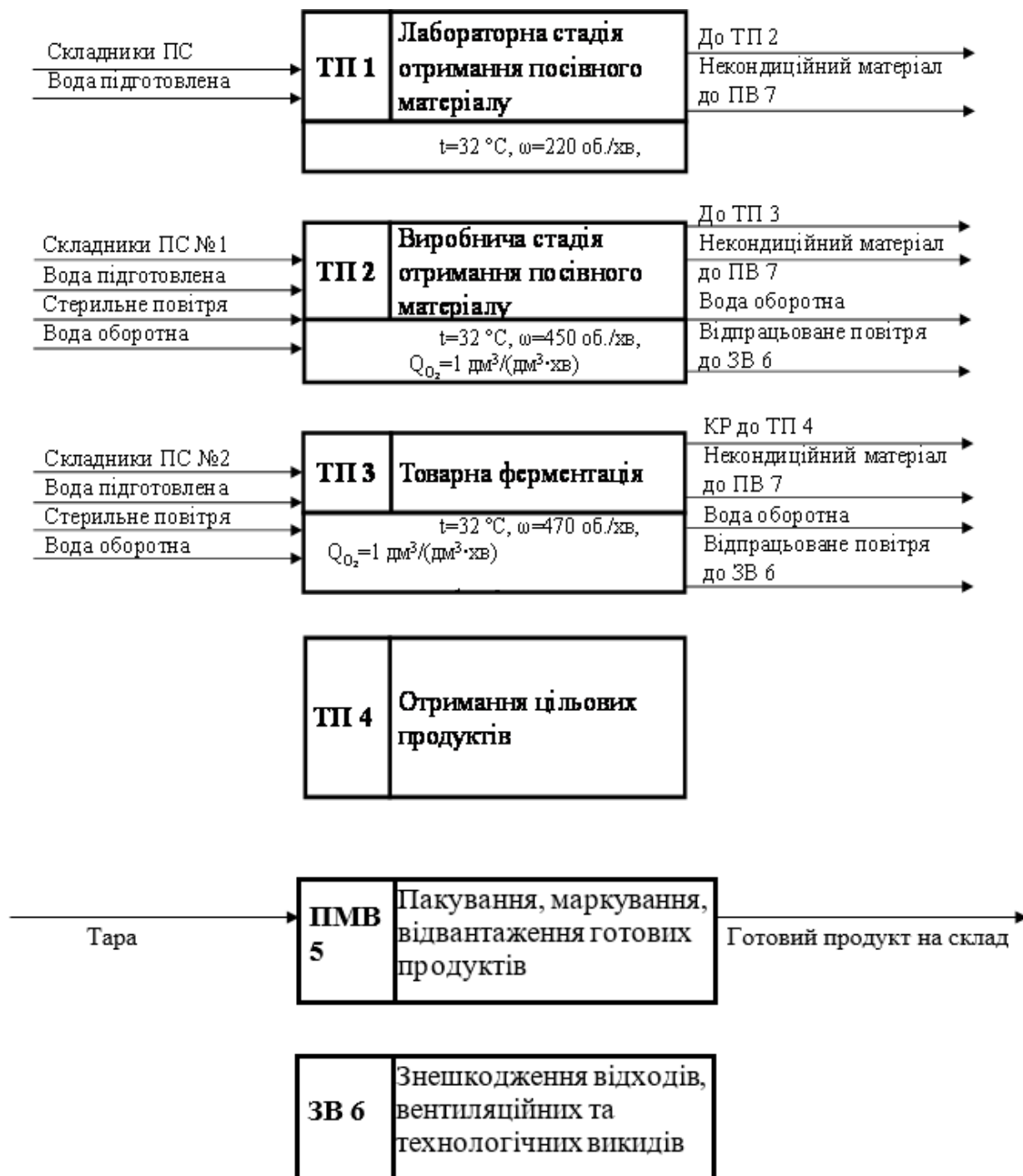
Ф-1,2 – фільтри для стерилізації повітря; Ф-3 – фільтр відпрацьованого повітря; В-1,2 – ваги; Р-1 – інокулятор; Р-2 – виробничий ферментер; Н-1,2 – відцентрові насоси; Р-3 – реактор для прогрівання супернатанту КР та осадження біокомплексу; Є-1 – ємність для приготування розчинів

Рисунок 4.2 – Апаратурно-технологічна схема одержання продуктів штаму *P. fluorescens* 8573

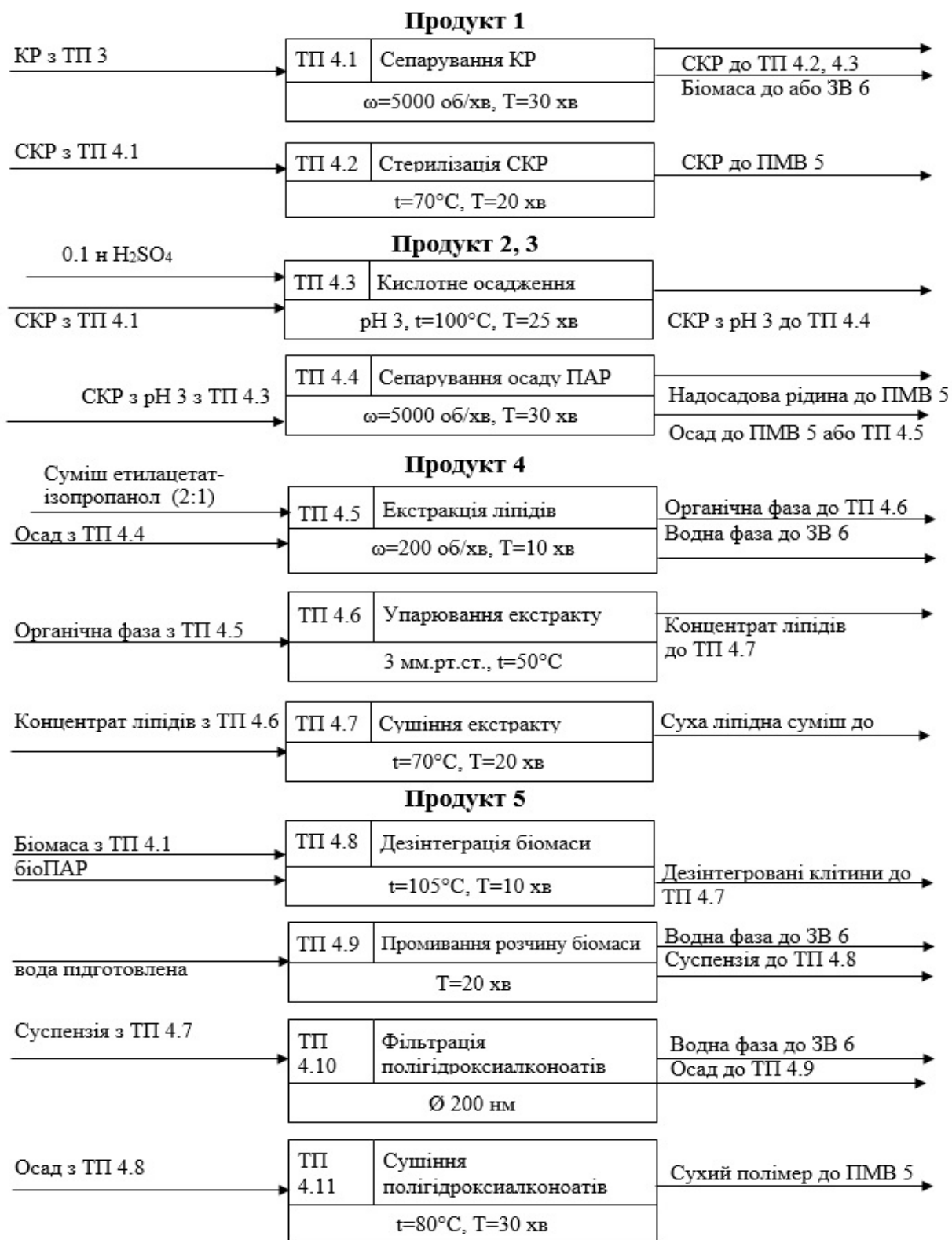


## 4.2.Опис технологічного процесу одержання продуктів *P. fluorescens* 8573

### Технологічна схема одержання поверхнево-активних продуктів штаму *P. fluorescens* 8573



**Технологічна схема одержання поверхнево-активних продуктів штаму *P. fluorescens* 8573 (цільові продукти)**





## **ТП 1. Лабораторна стадія вирощування посівного матеріалу**

### **ТП 1.1. Підтримання музейної культури**

Музейну культуру *P. fluorescens* 8573 зберігають у пробірках з агаризованим поживним середовищем під мінеральною оливою. Для підтримання активності культуру пересівають у пробірки зі свіжим середовищем 1 раз на рік. Всі роботи з музейною культурою проводяться в строго асептичних умовах.

### **ТП 1.2. Підготування середовища для лабораторної стадії вирощування посівного матеріалу**

Для вирощування штаму *P. fluorescens* 8573 у колбах на ротаційній качалці використовують ПС №1 наступного складу (г/дм<sup>3</sup>): гліцерин – 30; натрій цитрат – 4,0; NaNO<sub>3</sub> – 4,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O – 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5 [215].

Для приготування ПС колбу заповнюють водопровідною водою визначеного об'єму, вносять солі при перемішуванні до повного розчинення і додають відповідну кількість гліцерину. Приготоване поживне середовище розливають у колби і стерилізують в автоклаві за 132°C впродовж 20 хв.

### **ТП 1.3. Культивування у колбах**

Для вирощування рідкого посівного матеріалу першої генерації у колбах відбирають по 200 см<sup>3</sup> готового поживного середовища (див. ТП 1.2) і розливають у колби об'ємом 1 дм<sup>3</sup>.

У пробірку з робочою культурою *P. fluorescens* 8573, вносять 5 см<sup>3</sup> стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колбу з рідким поживним середовищем для ПМ. Колби поміщають на лабораторну качалку (220 об./хв) на 24 год. за температури 32±2 °C. Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність сторонньої мікрофлори мікроскопуванням.

#### **ТП 1.4. *Культивування посівного матеріалу в лабораторній ємності***

Для вирощування рідкого посівного матеріалу другої генерації у колбах відбирають по 200 см<sup>3</sup> готового поживного середовища (див. ТП 1.2) і розливають у колби об'ємом 1 дм<sup>3</sup>.

З посівного матеріалу, отриманого з ТП 1, культуральну рідину переносять в колби із стерильним поживним середовищем. Колби поміщають на лабораторну качалку (220 об./хв) на 24 год. за температури 32±2 °С. Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність сторонньої мікрофлори розсівом на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем та мікроскопуванням [218]. Титр клітин – не менше 2×10<sup>8</sup> КУО/см<sup>3</sup>. ПМ з колб використовують для засіву виробничого інокулятора (Р-1).

#### **ТП 2. *Виробнича стадія вирощування посівного матеріалу***

##### **ТП 2.1. *Приготування і стерилізація середовища для виробничої стадії вирощування інокуляту***

Використовують виробничий інокулятор (Р-1) об'ємом 50 дм<sup>3</sup>, обладнаний термостатуючою оболонкою та вихровою системою аерації.

Поживне середовище для культивування *P. fluorescens* 8573 в інокуляторі має такий же склад, як у колбах на качалці. У стерилізований й охолоджений інокулятор (Р-1) заливають 25 дм<sup>3</sup> водопровідної води (з урахуванням конденсату і 5 % ПМ з колб, загальний об'єм становить 30 дм<sup>3</sup>) і при працюючій мішалці засипають солі до повного їх розчинення та гліцерин, доводять рН до 7,0 10%-ним розчином HCl і стерилізують гострою парою за температури 120 °С впродовж 30 хв [215].

##### **ТП 2.2. *Одержання посівного матеріалу в інокуляторі Р-1***

Посівний матеріал з колб в стерильних умовах переносять в реактор (Р-1) зі стерильним поживним середовищем. Культивування проводять за швидкості перемішувального пристрою (450 об./хв) і подачі повітря 30 дм<sup>3</sup>/хв. Швидкість перемішування і витрати повітря регулюють за показниками концентрації

розчиненого кисню  $pO_2$ . Кожні 4 год процесу ферментації визначають оптичну густину середовища. Тривалість культивування 36 год.

Отриманий ПМ (титр клітин не менше  $2 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>), контролюють на присутність сторонньої мікрофлори і передають ПМ на засів ферментера (Р-2). Об'єм посівного матеріалу з інокулятора – 30 дм<sup>3</sup> [215].

### **ТП 3. Товарна ферментація**

#### **ТП 3.1. Підготування поживного середовища для товарної ферментації.**

Для ферментації у виробничому біореакторі (Р-2) готують оптимізоване поживне середовище №2 наступного складу г/дм<sup>3</sup>: соєва олія – 10; гліцерин – 30; натрій цитрат – 4,0;  $NaNO_3$  – 4,0;  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  – 2,0;  $KH_2PO_4$  – 1,2;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5.

Поживне середовище для культивування готують безпосередньо у ферментері (Р-2), загальний об'єм – 1 м<sup>3</sup>. У стерильний апарат заливають 600 дм<sup>3</sup> водопровідної води. Враховуючи внесення 30 дм<sup>3</sup> ПМ з інокулятора (Р-1), внесення гліцерину та утворення конденсату під час стерилізації гострою парою, загальний об'єм ПС становить 700 дм<sup>3</sup>. При працюючій мішалці засипають солі до повного розчинення, додають соєву олію та гліцерин, стерилізують гострою парою за 120°C впродовж 30 хв, охолоджують до  $32 \pm 2$  °C і відбирають пробу на аналіз (стерильність середовища) [217].

#### **ТП 3.2. Культивування продуцента у ферментері**

Виробниче культивування здійснюється у ферментері (Р-2) об'ємом 1 м<sup>3</sup> з робочим об'ємом 700 дм<sup>3</sup> з нижньопривідою турбінною мішалкою, термостатуючою сорочкою та системою вихрової аерації.

Засів ферментера (Р-2) проводять посівним матеріалом, отриманим в інокуляторі (Р-1). Кількість ПМ – 5% від об'єму середовища. Засів проводять при перекачуванні ПМ з інокулятора (Р-1) за допомогою стисненого стерильного повітря. Засівну лінію попередньо стерилізують гострою парою протягом 20 хв (120 °C).

Перемішуючий пристрій встановлюють на 450 об./хв, подачу повітря –700 дм<sup>3</sup>/хв. Впродовж ферментації кожні 5 год проводять мікробіологічний контроль, визначають оптичну густину ПС та вміст ПАР. Тривалість культивування складає 96 год [217].

#### **ТП 4. Отримання цільових продуктів *P. fluorescens* 8573**

##### ***Продукт № 1. Супернатант культуральної рідини***

##### **ТП 4.1. Сепарування культуральної рідини**

Культуральну рідину з ферментера Р-2 насосом Н-1 подають у тарілчастий сепаратор С-1. Волога біомаса періодично вивантажується автоматичним пристроєм у реактор Р-4, з якого його подають на сушку.

##### **ТП 4.2. Термічне оброблення супернатанту культуральної рідини [217]**

Супернатант культуральної рідини надходить у збірник Р-3, де його нагрівають глухою парою до температури 70 °С і витримують впродовж 20 хв при перемішуванні. До отриманого СКР додається консервант і продукт подається на фасування.

Продукт у вигляді супернатанту культуральної рідини характеризується такими показниками: вміст ПАР– 15,0±0,5 г/дм<sup>3</sup>, поверхневий натяг – 29,0±0,8 мН/м; індекс емульгування – 80±3 %.

##### ***Продукти № 2 – Біокомплекс(концентрат ПАР) та № 3 Надосадова рідина***

##### **ТП 4.3. Кислотне осадження рамноліїдного біокомплексу**

Супернатант культуральної рідини у реакторі Р-3 доводять до рН 3,0 10% розчином НС1, який подають з ємності Є-1, при перемішуванні і нагріванні до 100 °С.

##### **ТП 4.4. Центрифугування осаду ПАР**

Одержану суспензію з реактора Р-3 подають насосом Н-2 у сепаратор С-1. Вологий осад ПАР (*Продукт № 2*) вивантажується у збірник 3-1, з якого він

подається на фасування. Фугат – надосадова рідина –(*Продукт № 3*) подається в збірник 3-2, з якого він також подається на фасування.

#### ***Продукт №4. Рамноліпіди***

##### **ТП 4.5. Екстракція рамноліпідів**

Із сепаратора С-1 вологий осад ПАР подають у реактор Р-5 для екстракції при перемішуванні.

##### **ТП 4.6. Фільтрація рамноліпідів**

Екстракт з Р-5 подається на фільтр Ф-4, а відпрацьовані екстрагенти – на регенерацію.

##### **ТП 4.7. Сушіння рамноліпідів.**

Із фільтра Ф-4 насосом Н-5 розчин ліпідів подається на сушарку ВСШ-1. Після сушіння продукт подається на фасування.

#### ***Продукт № 5. Полігідроксиалканоати***

##### **ТП 4.8. Дезінтеграція біомаси**

Біомасу із збірника 3-1 подають у реактор Р-4, де її дезінтегрують за допомогою біоПАР (рамноліпідів) при перемішуванні і нагріванні до 100 °С.

##### **ТП 4.9. Промивання біомаси.**

Дезінтегровану біомасу із Р-4 передають у реактор Р-5, де її багаторазово промивають водою для видалення залишків білка. Після відмивання одержану суспензію передавлюють стиснутим повітрям через фільтр Ф-4.

##### **ТП 4.10. Сушіння полігідроксиалканоату**

Фільтрат з Ф-4 переносять у вакуум-сушильну шафу ВСШ-1, з якої продукт подають на фасування.

#### **ПМВ 5. Пакування, маркування, відвантаження продукту [218]**

Маркування виконується державною мовою і мовою, що обумовлена в контракті на поставку. На кожен пакувальну одиницю наносять маркування або етикетку з даними: назва підприємства-виробника, адреса, товарний знак, номер партії, маса нетто, дата виготовлення, термін придатності до використання.

Продукт № 1 (супернатант культуральної рідини) та № 4 (надосадова рідина) пакуються у поліетиленові каністри об'ємом 10 дм<sup>3</sup>. Термін зберігання – за температури не вище 5 °С – 6 місяців при додаванні. Продукт № 2 (біоПАР – біокомплекс), № 3 (полігідроксисалікати) та продукт №5 (рамноліпіди) пакуються у герметичні поліетиленові пакети масою 100 г. Термін зберігання (за температури не вище 10 °С) – 1 рік.

### **ЗВ 6. Знешкодження відходів [218]**

Останньою стадією технологічного процесу є регенерація і знешкодження відходів, а саме некондиційного посівного матеріалу, вентиляційного та технологічного повітря при їх викидах в атмосферу, партій бракованого препарату, залишків пакувальних матеріалів тощо. Дана стадія забезпечує екологічну чистоту виробництва даних продуктів.

**ЗВ 6.1.** Нейтралізація та каналізування стоків. Схема очистки стічних вод включає первинну і вторинну очистку. Первинна включає механічне відділення забруднень (вловлювання крупних домішок), а вторинна – очистка стічних вод в системі очисних споруд.

Суміш розчинників після екстракції ПАР подається на регенерацію.

**ЗВ 6.2.** Очистка повітряних викидів. Очистка повітря від механічних домішок здійснюється в циклонах. Очищене повітря йде в атмосферу, а твердий осад – змішується зі стоками (ЗВ 6.1) і подається на біологічну очистку.

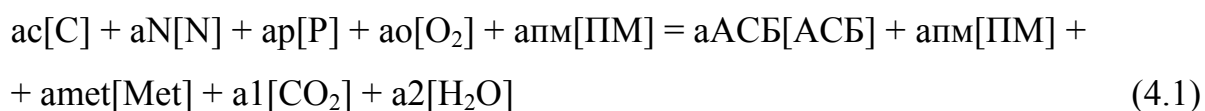
### 4.3. Матеріальний баланс процесу ферментації

Встановлено, що стаціонарна фаза росту досягається після 72 год культивування, при цьому максимальна концентрація АСБ становить  $X_{\max} = 3,80$  г/дм<sup>3</sup>. Максимальна питома швидкість росту спостерігається в середині експоненційної фази росту (30–40 год) і становить  $\mu_{\max} = 0,18$  год<sup>-1</sup>. Активне нагромадження рамноліпідів починається вже через 24 год і досягає максимуму після 120 год культивування,  $RL_{\max} = 5,50$  г/дм<sup>3</sup>. Максимальна продуктивність культури спостерігалася після 72 год культивування і становила  $P_{\max} = 0,082$  г/дм<sup>3</sup>·год<sup>-1</sup>.

Економічний коефіцієнт ферментації ( $Y_{x/s}$ ), вихід ПАР від субстрату ( $Y_{p/s}$ ) та ПАР-синтезувальна здатність біомаси ( $Y_{p/x}$ ) становлять, відповідно,  $Y_{x/s} = 0,147$  г/г;  $Y_{p/s} = 0,229$  г/г;  $Y_{p/x} = 1,447$  г/г.

Одержані експериментальні дані дають можливість розрахувати матеріальний баланс біосинтезу ПАР штамом *P. fluorescens* 8573, склавши інтегральне стехіометричне рівняння процесу ферментації [218].

У загальному вигляді рівняння ферментації матиме такий вигляд:

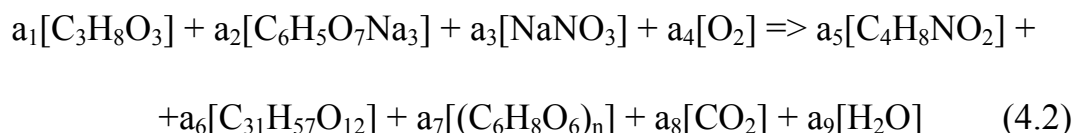


де  $a_s, a_N, \dots, a_2$  – стехіометричні коефіцієнти;

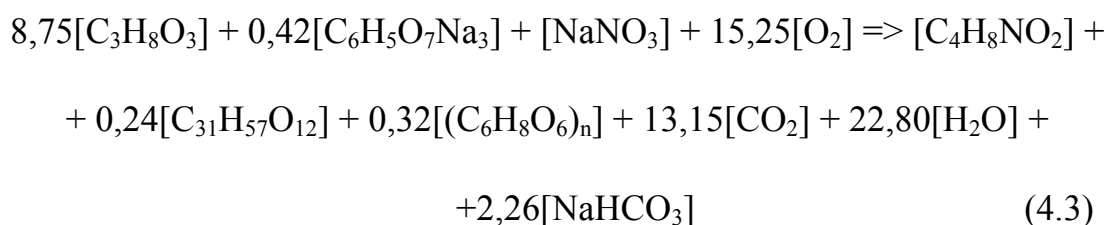
$[C], [N], \dots, [H_2O]$  – брутто-формули речовин, що приймають участь в метаболітичних процесах.

Джерелом вуглецю і енергії  $[C]$  в даному випадку є гліцерин ( $C_3H_8O_3$ ) та натрію цитрат ( $C_6H_5O_7Na_3$ ), джерелом азоту  $[N]$  – натрію нітрат ( $NaNO_3$ ). Джерелом фосфору в даному рівнянні можна знехтувати, оскільки у поживному середовищі фосфор міститься у надлишку у вигляді фосфатного буферу. Орієнтовний кількісний склад абсолютно сухої біомаси для бактерій роду *Pseudomonas* можна записати у вигляді  $C_4H_8NO_2$  [219]. Цільовими продуктами

метаболізму є суміш монорамноліпиду RL1 ( $C_{26}H_{48}O_9$ ) та дирамноліпиду RL2 ( $C_{32}H_{58}O_{13}$ ) у співвідношенні 1:6 [220], а також полісахарид-альгінат  $((C_6H_8O_6)_n)$ . Для спрощення розрахунків узагальнену формулу рамноліпідів можна записати у вигляді –  $C_{31}H_{57}O_{12}$ .



Розв'язавши дане рівняння, отримаємо інтегральне стехіометричне рівняння ферментації штаму *P. fluorescens* 8573у вигляді [215]:



На основі даного рівняння складаємо матеріальний баланс ферментації (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

**Матеріальний баланс процесу ферментації (215)**

Взято, кг		Одержано, кг	
Гліцерин	30	АСБ	3,8
Натрію цитрат	4,0	Рамноліпиди	5,5
NaNO <sub>3</sub>	4,0	Полісахарид	2,1
Аераційний кисень	18,2	Ендогенна вода	15,3
		Вуглекислий газ	21,5
		NaHCO <sub>3</sub>	7,1
		NaNO <sub>3</sub> (надл.)	0,9
Всього	56,2	Всього	56,2



Із матеріального балансу видно, що для синтезу 3,8 кг АСБ необхідно 18,2 кг кисню. Отже для синтезу 1 кг АСБ потрібно  $18,2/3,8=4,8$  кг  $O_2$ /кг АСБ. Максимальна продуктивність процесу біосинтезу становить:

$$g = \frac{\mu \cdot X}{4} = \frac{0,18 \cdot 3,8}{4} = 0,171 \text{ кг АСБ}/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$$

Тоді максимальна потреба в кисні буде становити  $0,171 \cdot 4,8 = 0,82$  кг  $O_2$ /( $\text{м}^3 \cdot \text{год}$ ).

Кисень витрачається не тільки на синтез нової біомаси, але і на підтримку життєдіяльності вже синтезованої біомаси, тому практичну потребу в кисні потрібно збільшити на 20 % [218]. Отже, дійсна потреба в кисні буде становити  $m = 0,82 \cdot 1,2 = 0,98 \approx 1$  кг  $O_2$ /( $\text{м}^3 \cdot \text{год}$ ).

Основне рівняння масопередачі за киснем має вигляд:

$$m = K_L a (C_p - C) \quad (4.4)$$

де  $m$  – кількість кисню, що передається через одиницю об'єму в одиницю часу, кг/( $\text{м}^3 \cdot \text{год}$ );

$K_L a$  – об'ємний коефіцієнт масопередачі за киснем,  $\text{год}^{-1}$ ;

$C_p$  – рівновагова концентрація кисню в рідині,  $\text{кг}/\text{м}^3$ ;

$C$  – дійсна концентрація розчиненого кисню в рідкій фазі,  $\text{кг}/\text{м}^3$ .

Оскільки кисень з культуральної рідини поглинається біомасою майже миттєво, то для практичних розрахунків концентрацією кисню в рідині  $C$  можна знехтувати. Тоді рівняння набуде вигляду:

$$m = K_L a \cdot C_p \quad (4.5)$$

Рівновагову концентрацію кисню розраховують за формулою:

$$C_p = p \cdot y / m_{pc} \quad (4.6)$$

де  $p$  – тиск повітря в культуральній рідині (МПа), приймаємо  $p = 0,13$  МПа;

$y$  – об’ємний вміст кисню в газі, що подається на аерацію, для повітря  $y = 0,21$ ;

$m_{pc}$  – константа фазової рівноваги ((Па·м<sup>3</sup>)/кг), для культуральних рідин:  $m_{pc} = 35 \cdot 10^5$  (Па·м<sup>3</sup>)/кг.

$$\text{Таким чином } C_p = \frac{1,3 \cdot 10^6 \cdot 0,21}{35 \cdot 10^5} = 7,8 \cdot 10^{-3} \text{ кг O}_2/\text{м}^3.$$

Тоді, об’ємний коефіцієнт масопередачі за киснем повинен становити:

$$K_L a = 0,98 / 7,8 \cdot 10^{-3} = 125 \text{ год}^{-1}.$$

Об’ємний коефіцієнт масопередачі за киснем залежить від багатьох факторів, наприклад від способу аерації, витрати повітря на аерацію, конструкції апарату, об’єму та висоти шару культуральної рідини, конструкції перемішувального пристрою та пристрою для подачі повітря тощо.

#### 4.4. Розрахунок економічної ефективності технології отримання ПАР

##### *P. fluorescens* 8573

Економічну доцільність технології нового продукту оцінюють за її собівартістю, яка є грошовим виразом витрат підприємства на виробництво і реалізацію цієї продукції [221].

У промисловості найчастіше застосовується калькуляційні статті витрат:

- 1) сировина і матеріали;
- 2) паливо та енергія на технологічні цілі;

- 3) основна заробітна плата технологічних робітників;
- 4) додаткова заробітна плата технологічних робітників;
- 5) відрахування на соціальні заходи;
- 6) витрати на утримання і експлуатацію устаткування;
- 7) загальновиробничі витрати;
- 8) втрати внаслідок технічно неминучого браку;
- 9) інші виробничі витрати;
- 10) адміністративні витрати;
- 11) витрати на підготовку та освоєння нового виробництва;
- 12) позавиробничі витрати на збут продукції.

Розрахунок економічної ефективності здійснено по статтях витрат, що оптимізувалися у роботі: витрати на сировину та матеріали і витрати на електроенергію. Для визначення їх впливу на загальний економічний ефект технології [221], проаналізовано економічні показники для одержання 1 кг ПАР у різних умовах:

- 1) у колбах;
- 2) у ферментері з вихровою системою аерації.

Витрати на сировину і матеріали розраховуються як сума добутоків норм витрачання різних видів сировини й матеріалів та вартості одиниці відповідних видів сировини й матеріалів:

$$B_m = \sum P_i \cdot C_i \quad (4.7)$$

де  $P_i$  – витрата  $i$ -того виду матеріальних ресурсів, кг;

$C_i$  – ціна  $i$ -того виду матеріальних ресурсів, грн./кг.

В якості сировини - компоненти ПС для культивування штаму *P. fluorescens* 8573 (ціни з каталогу реактивів [https://www.systopt.com.ua/prodcut-category/reaktyvy\\_ta\\_khimichna\\_syrovana/neorhanichni\\_rechovyny](https://www.systopt.com.ua/prodcut-category/reaktyvy_ta_khimichna_syrovana/neorhanichni_rechovyny) за 2018 рік). Вартість компонентів для отримання 1 м<sup>3</sup> ПС – у табл. 4.2.

Таблиця 4.2.

Вартість сировини для одержання 1 м<sup>3</sup> ПС

№	Компонент поживного середовища	Кількість сировини, витрачена на 1 м <sup>3</sup> ПС, кг	Вартість сировини, грн./кг	Вартість сировини, грн./м <sup>3</sup> ПС
1	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	30,0	48,8	1464,0
2	NaNO <sub>3</sub>	4,0	19,2	76,8
3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	42,0	50,4
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×3H <sub>2</sub> O	2,0	102,0	204,0
5	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5	8,1	4,05
6	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ×2H <sub>2</sub> O	4,0	48,8	195,2
Разом				1994,45

Витрати на електроенергію визначаються за формулою:

$$E_c = \sum W_i \cdot \Phi_{ci} \cdot T_{pi}, \quad (4.8)$$

де  $W_i$  – потужність електроспоживачів, кВт;

$\Phi_{ci}$  – фонд роботи електричного обладнання, год;

$T_{pi}$  – тариф, грн/кВт·год. (1,68 грн./кВт·год.).

При культивуванні штаму *P. fluorescens* 8573 в лабораторних умовах у колбах використовується наступне електрообладнання: ротаційна качалка (0,85 кВт), термостат (2 кВт). За один цикл роботи лабораторної качалки (120 год.) можна отримати 4,5 дм<sup>3</sup> КР, при цьому затрачається 182 кВт·год. електроенергії.

При культивуванні штаму *P. fluorescens* 8573 у ферментері використовується наступне електрообладнання (табл. 4.3):

Таблиця 4.3

**Потужність обладнання для одержання ПАР *P. fluorescens* 8573 у вихровому ферментері**

№	Назва обладнання	Ферментер з вихровою системою аерації, кВт
1	Перемішуючий пристрій	3,0
2	Компресор повітря	3,0
3	Термостат	2,0

Вартість поживного середовища та електроенергії, що затрачаються на 1 цикл культивування *P. fluorescens* 8573 1 кг одержаних ПАР в залежності від способу культивування наведено у таблиці 4.4. При цьому враховувався вихід ПАР, час культивування та коефіцієнт завантаження ферментера (0,7) при загальному об'ємі 1 м<sup>3</sup>. Отже, кінцева собівартість одержання 1 кг ПАР у ферментері зменшилася у 45,5 раз.

Оскільки розрахунок економічної ефективності проводили тільки по перших двох статтях витрат, тобто приблизно 20 % повної собівартості продукції, то повна собівартість 1 кг ПАР після оптимізації:  $255,84/0,2 = 1279,2$  грн./кг. За умови, що рентабельність виробництва становитиме 40 %, відпускна ціна 1 кг ПАР буде  $1279,2 \cdot 1,4 = 1790,88$  грн./кг або 60 \$. На даний час ринкова ціна на подібну продукцію іноземних виробників становить 70-180 \$, що свідчить про економічну ефективність та ринкову конкурентоспроможність технології.

Таблиця 4.4.

**Вартість витрат для одержання 1 кг ПАР штаму  
*P. fluorescens* 8573 за різних умов культивування**

Умови культивування	Вихід ПАР, кг/м <sup>3</sup>	Час ферментації, год.	Вартість ПС, грн.		Вартість електроенергії, грн.		Собівартість 1 кг ПАР, грн/кг.
			за 1 цикл	на 1 кг ПАР	за 1 цикл	на 1 кг ПАР	
У колбах	6	120	8,97	332,22	305,76	11324,44	11656,66
У ферментері вихровою системою аерації	15	96	1396,115	132,96	1290,24	122,88	255,84

#### 4.5. SWOT-аналіз та порівняльні характеристики рамноліпідних ПАР та їх аналогів

SWOT-аналіз широко застосовується у процесі стратегічного планування, зокрема при впровадженні нових продуктів і технологій і полягає і розділенні чинників на чотири категорії:

- сильні (Strengths)
- слабкі (Weaknesses)
- можливості (Opportunities), що відкриваються при його реалізації,
- та загрози (Threats), пов'язаних з його здійсненням.

*Strengths.* Переваги біосурфактантів, порівняно з синтетичними ПАР є активність за низьких концентрацій, різних рН і вмісті солей, термостійкість, нетоксичність, біорозкладання.

Основними інноваційними аспектами є:

— поновлювана, природна сировина для виробництва біоПАР, зокрема відходи виробництв;

- емульгування різних олій, вуглеводнів тощо;
- регулювання активності ферментів, транспорту біологічно активних речовин у клітини;
- біосумісність і засвоюваність.

*Weaknesses.* Особливості біотехнологій:

- високі матеріальні витрати для розвитку технології;
- необхідність удосконалення технологій;
- обмеженість ринкових досліджень.

*Opportunities.* - БіоПАР можуть задовольняти потреби сучасного ринку у натуральних продуктах нового покоління, зокрема з поверхнево-активними властивостями (ефективних й екологічно безпечних).

- Завдяки унікальним поліфункціональним властивостям біоПАР мають значний потенціал для різних галузей промисловості, сільського господарства, а також для заміни синтетичних ПАР

*Threats.* Недостатній досвід виробництва і застосування біоПАР, а також, слабка інформованість споживачів про властивості, галузі застосування біоПАР, можливості заміни синтетичних ПАР у сучасних технологіях.

Проведено порівняльний аналіз основних властивостей отриманих продуктів у порівнянні з існуючими на ринку препаратами синтетичних та біогенних ПАР (табл. 4.5).

Порівняння основних функціональних характеристик ПАР, що представлені у табл. 4.5, свідчить про перспективність і конкурентоспроможність розроблених продуктів штамів *Pseudomonas* порівняно з комерційними препаратами ПАР для сучасних екологічно-безпечних технологій.

Таблиця 4.5.

**Порівняльні характеристики рамноліпідних ПАР з комерційними препаратами**

Характеристики	Рамноліпідні ПАР	ДДС	Тритон X-100	AGAE Technologies	Urumqi Unite Bio-Technology
ККМ, г/дм <sup>3</sup>	0,05- 0,14	0,26	0,65	0,02-0,15	0,05-0,10
Міжфазний натяг (гас), мН/м	0,009-0,2	0,1	0,4	0,08	0,09
Кратність піни	7	8	6	9	6
Ціна, USD/кг	70-180	90	70	320	400-1600

**Висновки до розділу 4**

На основі отриманих результатів розроблено технологію виробництва поверхнево-активних продуктів штаму *P. fluorescens* 8573, що дозволяє одержати 5 форм продуктів для практичного застосування. Проведено економічний розрахунок орієнтовної ціни біоПАР. Проведено SWOT-аналіз технології отримання біоПАР та показано, за характеристики рамноліпідні ПАР є конкурентоспроможними препаратами на сучасному ринку.

**Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

Єрохін В. А., Покинсьброд Т. Я., Карпенко О. В. Поверхнево-активні препарати на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. *Наукові праці Донецького національного технічного університету. Серія: Хімія і хімічна технологія*. 2008. №134 (10). С. 111-117.



## РОЗДІЛ 5. ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ ШТАМІВ *PSEUDOMONAS*

### 5.1. Емульгувальні і поверхнево-активні властивості продуктів штамів *Pseudomonas*

Проаналізовано деякі фізико-хімічні властивості продуктів біосинтезу досліджених штамів: супернатанту культуральної рідини *P. aureofaciens* NB-1, вирощеного на гліцерині і соєвій олії, а також СКР і надосадової рідини *Pseudomonas* sp. PS-17 і *P. fluorescens* 8573 (табл.5.1).

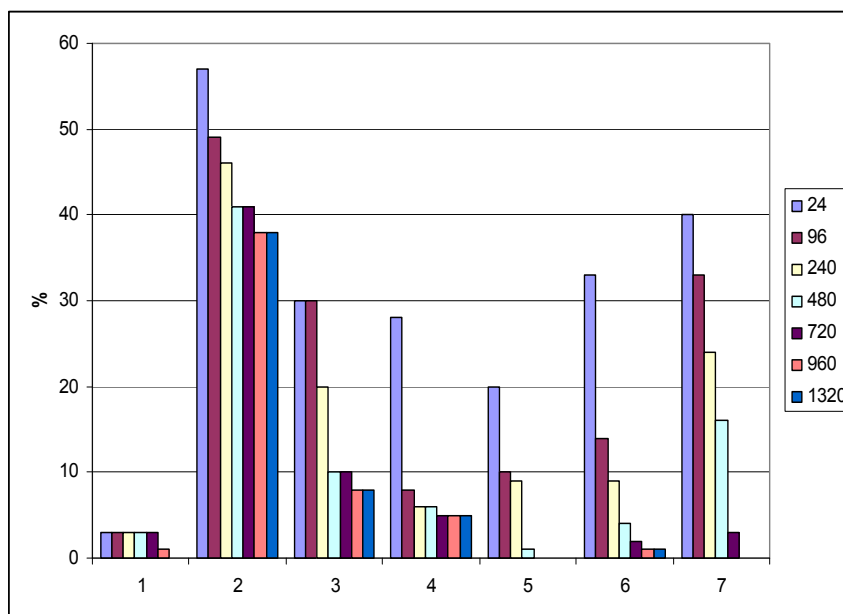
Таблиця 5.1.

#### Фізико-хімічні властивості ПАР штамів *Pseudomonas*

Штам	Продукт	Джерело вуглецю	ПАР, г/дм <sup>3</sup>	Поверхневий натяг, мН/м	Емульгування соняшникової олії, % E <sub>24</sub>
<i>P. aureofaciens</i> NB-1	СКР	гліцерин	3,9	29	50
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	НОР	гліцерин	1,8	37	10
		соєва олія	8,2	35	35
<i>P. fluorescens</i> 8573	СКР	гліцерин	5,3	28	45
		соєва олія	8,4	28	50
	НОР	гліцерин	1,9	32	35
		соєва олія	8,1	33	50

Як показали результати табл. 5.1, продукти, отримані на економічно вигідних субстратах штамів *Pseudomonas*, ефективно знижують поверхневий натяг розчинів та володіють здатністю утворювати емульсії.

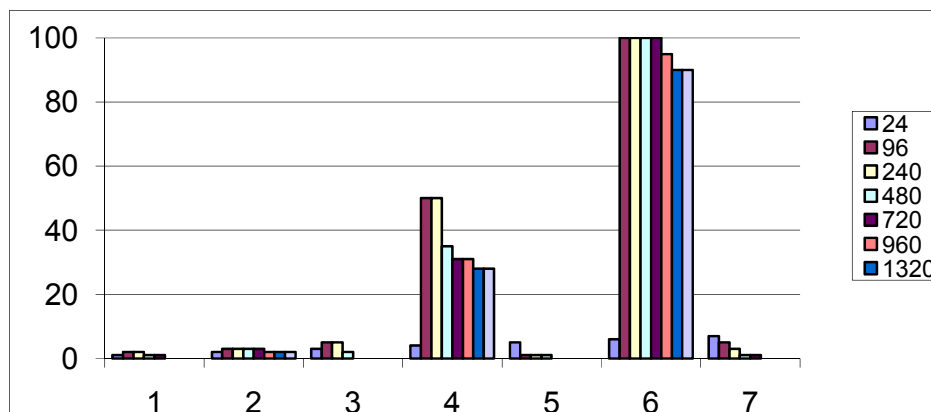
**Емульгувальна здатність** штамів *Pseudomonas* є практично важливим показником для багатьох галузей їх використання. Вивчено динаміку емульгування (індекс емульгування) супернатантів КР штамів *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas sp.* PS-17 щодо низки різних гідрофобних речовин. Визначено, що СКР культури *Pseudomonas sp.* PS-17 найефективніше емульгує бензол ( $E_{24}=57\%$  через добу та  $38\%$  - через 55 діб), проте слабо емульгує змащувальне мастило ( $3\%$ ) (рис.5.1).



**Рис. 5.1. Стійкість емульсій вуглеводнів з супернатантом КР *Pseudomonas sp.* PS-17 (індекс емульгування через 24-1320 год): 1-мастило, 2-бензол, 3-гексадекан, 4-циклогексанол, 5-вазелінова олія, 6-нафта, 7-соняшникова олія**

Як свідчать дані (рис.5.1), індекс емульгування  $E_{24}$  супернатанту КР *Pseudomonas sp.* PS-17 є досить високими і становлять 20-40%. Стабільними у часі були емульсії бензол-СКР (стійкі протягом 2-х місяців) та соняшникова олія-СКР (стабільні протягом 3-х тижнів).

Супернатант КР штаму *P. fluorescens* 8573 із досліджуваних вуглеводнів найефективніше емульгував нафту –  $E_{24}$  становить 100%. Емульсія була стабільною, практично не змінювалася у часі – 95 % через 2 місяці (рис. 5.2).



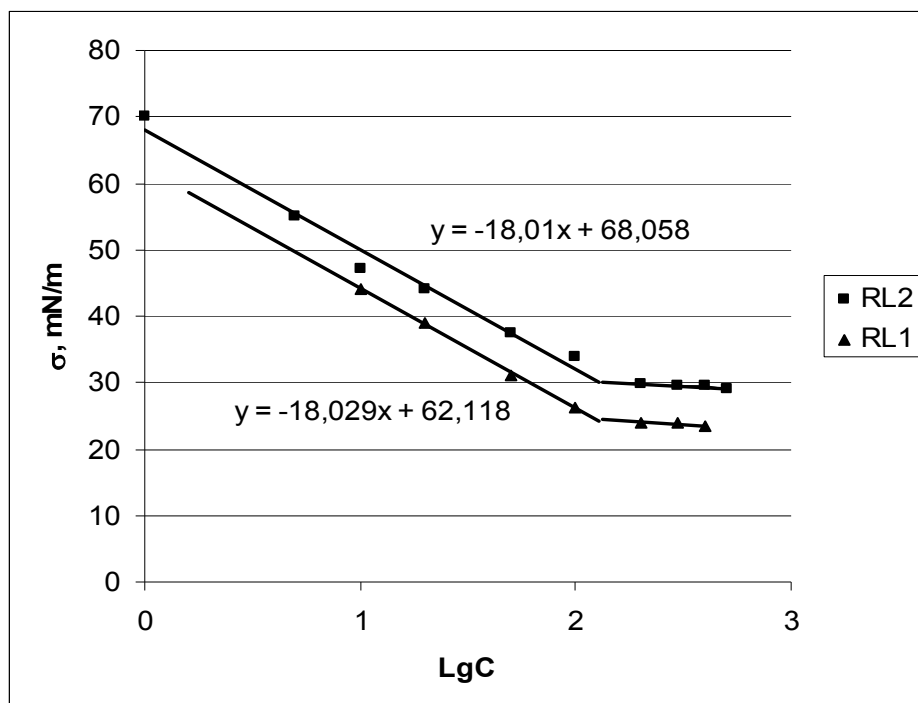
**Рис. 5.2. Стійкість емульсій вуглеводнів з супернатантом КР *P. fluorescens* 8573 (індекс емульгування через 24-1320 год):** 1-мастило, 2-бензол, 3-гексадекан, 4-циклогексанол, 5-вазелинова олія, 6-нафта, 7-соняшникова олія

Відносно стабільним є показник емульгування  $E_{24}$  циклогексанолу – 50% на другу добу та 28 % через 2 місяці. Для інших використаних вуглеводнів індекс емульгування низький -  $E_{24}$  1-5% (рис. 5.2).

Отже, супернатант КР *Pseudomonas sp.* PS-17 утворює стійку та стабільну в часі емульсію з рослинною олією і бензолом, а супернатант *P. fluorescens* 8573 – з нафтою й циклогексанолом. Це вказує на перспективу їх використання як ефективних промислових емульгаторів у різних технологічних процесах.

Отримані моно- і диамноліпіди штамів *Pseudomonas* є високоефективними ПАР, про що свідчать низькі значення поверхневого натягу – для РЛ1 він становив 24 мН/м, а для РЛ2 – 28 мН/м. Побудовано ізотерми адсорбції при температурі 25°C та рН 7 (рис. 5.3), на основі яких визначено

критичні концентрації міцелоутворення. Встановлено, що показники ККМ для РЛ1 й РЛ2 становлять 131,8 мг/дм<sup>3</sup>.



**Рис. 5.3. Ізотерми адсорбції рамноліпідів РЛ1 і РЛ2 у напівлогарифмічних координатах**

**Солюбілізаційні властивості рамноліпідного біокомплексу.** Важливою характеристикою поверхнево-активних речовин є солюбілізаційні параметри, які характеризують здатність даного сурфактанта до процесів десорбції гідрофобних речовин з поверхонь, а також до створення різних мікроемульсій. Для оцінки ефективності процесу солюбілізації, як правило, використовують коефіцієнт солюбілізації. Масовий коефіцієнт солюбілізації (МКС) визначали за графіком залежності концентрації засолюбілізованого додекану від концентрації біосурфактанту, він рівний величині тангенсу кута нахилу отриманої прямої. Визначено, що масовий коефіцієнт солюбілізації рамноліпідного біокомплексу становив 0,0855 (в перерахунку на суху

речовину). Мольний коефіцієнт сольобілізації становить 4,02. Для визначення мольного коефіцієнту сольобілізації встановлювали молекулярну масу РБК. При порівнянні приведених в'язкостей розчинів стандартних полісахаридів та розчину комплексу такої ж концентрації визначено, що молекулярна маса комплексу становить 7,5-9 тис.

**Гідрофільно-ліпофільний баланс рамноліпідів.** Показник ГЛБ поверхнево-активних речовин є досить формальним, але він може бути дуже корисним для визначення областей їх застосування. За табличними даними щодо показників гідрофільності або ліофільності груп, які входять до складу структурної формули сурфактантів, визначено їх гідрофільно-ліофільні баланси. Розрахований ГЛБ монорамноліпиду становить 13, а дирамноліпиду – 21. Це вказує на те, що вони можуть утворювати стабільні емульсії типу «олія у воді», а, отже, використовуватись в якості емульгаторів, наприклад, у харчовій промисловості. Монорамноліпід можна використовувати також як ефективний детергент або миючий засіб при виробництві шампунів, гелів й пінок у косметології та хімічній промисловості. Порівняльний аналіз рамноліпідних ПАР із існуючими в наш час хімічними сурфактантами свідчить, що за показником ГЛБ рамноліпід подібні до полісорбатів (ГЛБ 3-16), Твінів (Е 432 - Е 436, ГЛБ 10-15) або ефірів сорбітану (ГЛБ 3-16). Тобто, їх можна використовувати у харчовій промисловості як замітники хімічних ПАР для диспергування нерозчинних у воді ароматизаторів, ефірних олій, екстрактів прянощів у напоях і харчових продуктах.

**Піноутворення.** Здатність до піноутворення є важливою характеристикою сурфактантів: у харчовій промисловості піноутворювачі створюють умови для рівномірної дифузії газоподібної фази в рідкі й тверді харчові продукти. Здатність до піноутворення та стабілізації піни є важливими показниками при виборі та виготовленні мийних засобів.

У таблиці 5.2 наведено коефіцієнти стійкості пін супернатантів аналізованих культур при їх культивуванні протягом 5 діб.

Таблиця 5.2.

**Піноутворювальні характеристики супернатантів культуральної рідини штамів *Pseudomonas***

СКР штаму	Коефіцієнт стійкості піни, %	Кратність піни, рази
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	88%	6,5
<i>P. fluorescens</i> 8573	50%	2,0
<i>P. aureofaciens</i> NB-1	15%	1,2

Із наведених у таблиці даних видно, що максимальною піноутворювальною здатністю володіє СКР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 – 88%, а найменшою – СКР *P. aureofaciens* NB-1. Отримані результати свідчать про можливість використання препаратів на основі супернатантів КР даних штамів у мийних засобах різного призначення.

Детально вивчено та досліджено фізико-хімічні властивості надосадових рідин (НОР) після кислотного осадження комплексів штамів *Pseudomonas*. Раніше показано, що у НОР залишається ще близько 3-5 г/дм<sup>3</sup> ліпідів залежно від способу їх отримання (див.табл. 3.1), отже вони є потенційними поверхнево-активними продуктами. Досліджено деякі фізико-хімічні властивості НОР, зокрема, поверхневий натяг й CMD (табл. 5.3).

Показано, що поверхневий натяг для НОР обох штамів, отриманих з нагріванням є дещо вищим (30-38 мН/м), ніж за охолодження (30-34 мН/м) за рахунок повнішого осадження ПАР. Показник CMD (розведення до величини ККМ) для прогрітих НОР становить 1,8-8,0, а для отриманих з охолодженням – вищий і становить 2-16, тобто, не всі ПАР осаджуються з СКР при виділенні біокомплексів, частина їх залишається у надосадових рідинах (табл. 5.3).

Таблиця 5.3.

**Фізико-хімічні властивості надосадових рідин, отриманих різними способами**

Поверхнево-активні характеристики	Штам	<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17		<i>P. fluorescens</i> 8573			
	Препарат (рН 7)	НОР		СКР	НОР		СКР
	Спосіб обробки	4°C, 24 год	100°C, 25 хв	28	4°C, 24 год	100°C, 25 хв	29
Поверхневий натяг, $\sigma$ , мН/м	НОР(CH <sub>3</sub> -COOH)	30	30		30	30	
	НОР (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	31	32		31	32	
	НОР (HCl)	34	34		34	38	
	НОР (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	31	32		30	32	
	НОР (HNO <sub>3</sub> )	34	34		34	38	
CMD (розвед. до величини ККМ)	НОР(CH <sub>3</sub> -COOH)	16	4	128	8	8	64
	НОР (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	4	4		2	2	
	НОР (HCl)	2	2		4	2	
	НОР (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	3,5	3		4	2	
	НОР (HNO <sub>3</sub> )	2	1,8		2	1,8	

Також досліджено здатність до емульгування надосадовими рідинами соняшникової олії і вазелінової оливи та їх піноутворювальні властивості (табл.5.4). Показано, що при рН 3 здатності до піноутворення й емульгування

властивостей препарати не проявляють, що пов'язано з їх хімічною природою - вони є слабо аніоногенними ПАР, тому й мало розчиняються у кислих водних розчинах.

Таблиця 5.4.

**Фізико-хімічні властивості надосадових рідин, отриманих різними способами**

Спосіб отримання НОР	рН	Е <sub>24</sub> , %		Піноутворення		Кути змочування (θ), град.		
		Сон. олія	Ваз. олива	Стійкість піни, %	Кратність	Скло	Політетрафлуоретен	Листок герані
HCl, 4°C, 24 год	3	0	0	0	0	20	35	10
	7	59	50	92	3,46	20	40	15
HCl, 100°C, 25 хв	3	0	0	0	0	17	40	92
	7	20	1	50	0,96	20	40	75
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4°C 24 год	3	0	0	0	0	20	37	20
	7	45	40	93	2,8	22	42	30
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100°C, 25 хв	3	0	0	0	0	20	45	80
	7	5	1	80	0,96	17	75	75
Вода	7	-	-	-	-	30	90	110
СКР	7	75	50	95	6,5	20	49	15

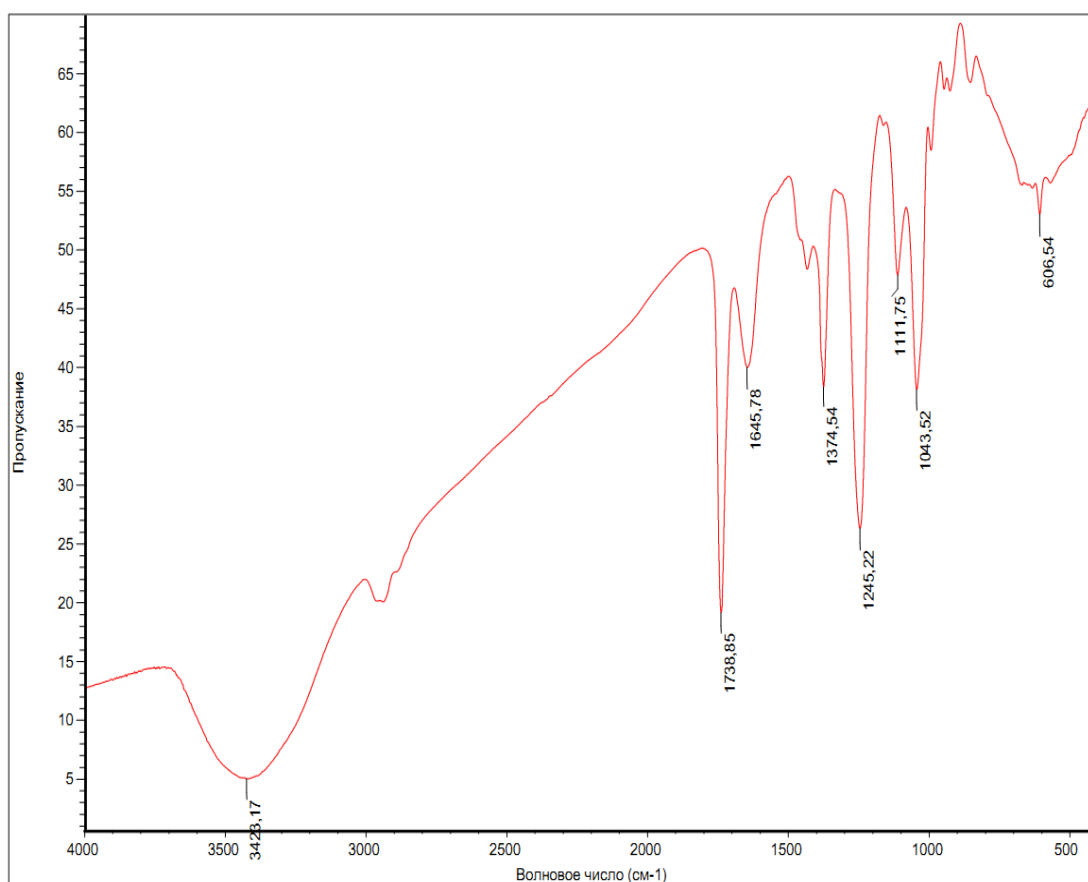
Проте, при рН 7 препарати, отримані підкисленням СКР з наступним його охолодженням, емульгують гідрофобні речовини значно краще – показник Е<sub>24</sub> для соняшникової олії 45-59%, а вазелінової оливи 40-50% (табл. 5.4). НОР, одержані з нагріванням слабо емульгують лише соняшкову олію – Е<sub>24</sub> 5-20%. Така різниця емульгувальних і піноутворювальних властивостей НОР



пояснюється меншим вмістом ПАР у цих НОР за рахунок повнішого осадження. Такі НОР можна застосовувати, наприклад, у композиційних мийних засобах з іншими ПАР, а НОР, одержані з охолодженням – також для рекультивації забруднених ґрунтів (за рахунок високих емульгувальних показників). Також встановлено змочувальну здатність НОР (табл. 5.4). Змочування поверхні важливе для багатьох галузей промисловості (лакофарбова, фармацевтична, косметична і т. д.) і сільського господарства. Для збільшення змочування до водних розчинів додають ПАР, в результаті знижується поверхневий натяг рідини, як наслідок, зміна крайового кута змочування поверхонь. Ці властивості ПАР використовується для покращення змочування гідрофобних поверхонь (жирних плям, сажі, металевого пилю і ін.) та в сільському господарстві для змочування гідрофобних поверхонь (листя, плодів та ін.). Визначено крайові кути змочування НОР на різних поверхнях: гідрофільна поверхня скла, гідрофобна – полімер політетрафлуоретен, а також листках герані. Показано, що НОР збільшують змочування поверхонь – крайовий кут листків герані прогрітими НОР –  $75^\circ$ , а отриманими з охолодженням –  $15-30^\circ$ , вода практично не змочує поверхню листка –  $110^\circ$ . Аналогічний ефект отримано для поверхні політетрафлуоретену (див. табл. 5.4).

Отже, НОР є ефективними ПАР та можуть використовуватись у композиційних мийних засобах з іншими ПАР, у косметології – для емульгування рослинних олій, як змочувач у складі агропрепаратів при обробці сільськогосподарської продукції та ін.

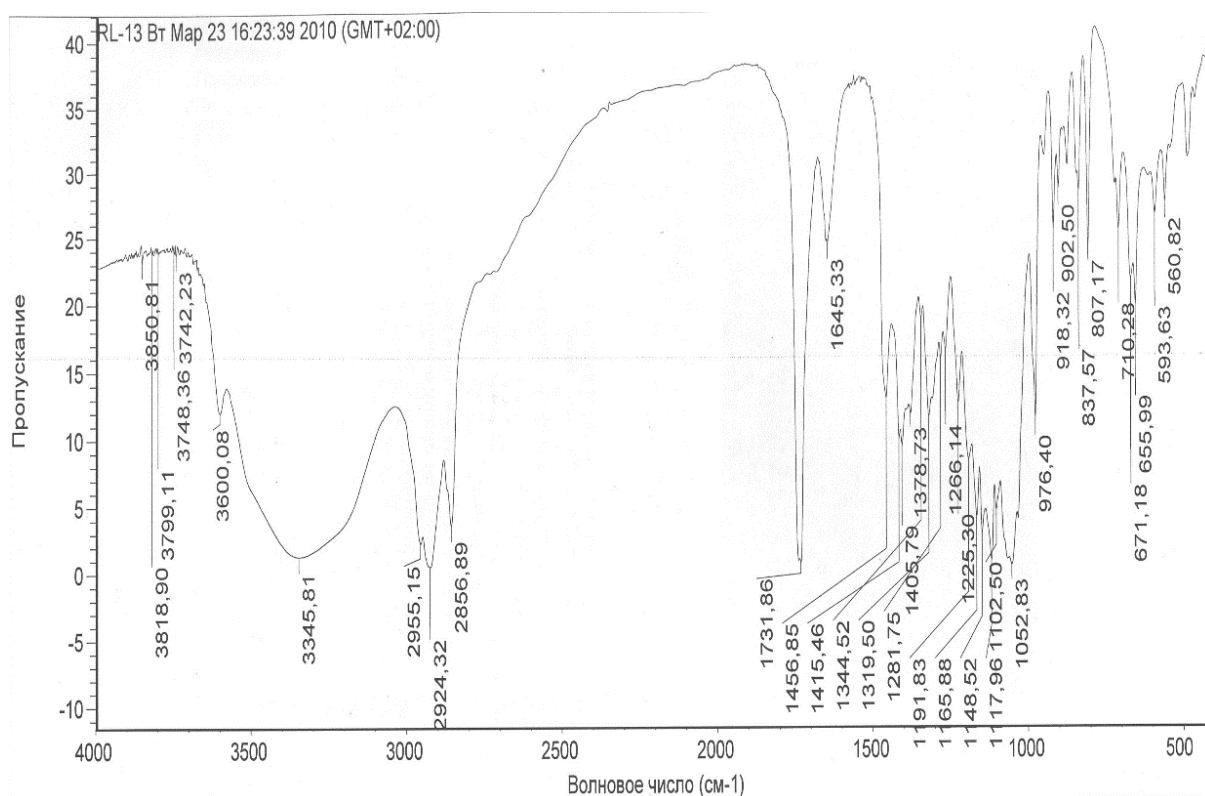
**Спектральні дослідження.** Досліджено ІЧ-спектри (у таблетках з КВг) зразка біосурфактанта штаму *P. fluorescens* 8573 (рис. 5.4, 5.5).



**Рис .5.4. ІЧ-спектри ліпопептидного ПАР штаму *P. fluorescens* 8573**

У спектрах зафіксовано такі смуги поглинання:  $3423,17 \text{ см}^{-1}$ , які характерні для валентних коливань груп N-H, смуга при  $1738,85 \text{ см}^{-1}$  відповідає коливанням групи C = O складноефірного зв'язку, а смуга при  $1645,78 \text{ см}^{-1}$  показує наявність -C=O розтягування  $2^\circ$  амідної групи. Валентні коливання груп C-H-CH<sub>3</sub>, обумовлені смугою  $1374,54 \text{ см}^{-1}$ . Отриманий ІЧ-спектр порівнювали з даними [217]. За результатами ІЧ-спектрів підтверджено, що один із компонентів біосурфактанту, що продукується *P. fluorescens* 8573, є ліпопептидом.

Інший компонент ПАР штаму *P. fluorescens* 8573 ідентифіковано як рамноліпід (рис. 5.5.).

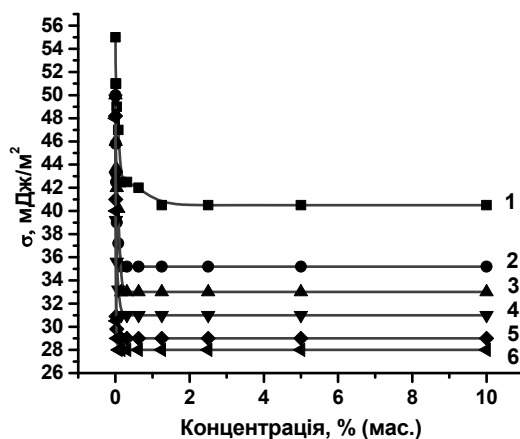


**Рис. 5.5.** ІЧ-спектр рамноліпідного ПАР штаму *P. fluorescens* 8573

У спектрі рамноліпідного компоненту штаму *P. fluorescens* 8573 виявлено основні смуги адсорбції: смуги 3430-3390  $\text{cm}^{-1}$  – валентні коливання О-Н, сильні піки при 2958-2855  $\text{cm}^{-1}$ , що відповідають розтягуванням  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , смуги 1739, 1730  $\text{cm}^{-1}$  – валентні коливання груп  $\text{C=O}$ , 1160-1050  $\text{cm}^{-1}$  – групи  $\text{C-O-C}$  розтягування у фрагменті рамнози. Такі характерні піки адсорбції в отриманому спектрі можуть показувати наявність циклів цукру рамнози, а також вуглеводневих ланцюгів, що підтверджує структуру рамноліпідів.

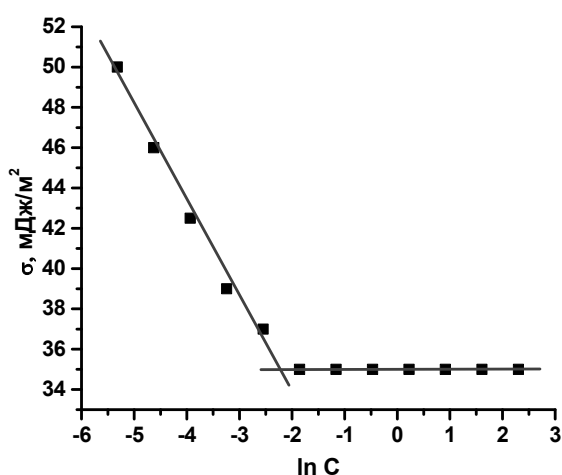
## 5.2. Колоїдні характеристики водних систем рамноліпідного біокомплексу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 з Твін-80

Дослідження колоїдно-хімічних властивостей сумішей поверхнево-активних речовин, синергізму й антагонізму їх дії є одним з актуальних напрямків фізичної хімії. В даний час пріоритетним є застосування біогенних поверхнево-активних речовин, які є малотоксичними та біодеградабельними, у різних мийних, піноутворювальних композиціях. У таких композиціях використовують й синтетичні ПАР, тому вплив сумішей різних за природою поверхнево-активних речовин на колоїдно-хімічні властивості водних розчинів викликає значний інтерес як з теоретичного, так і з практичного погляду. Вивчено колоїдні характеристики водних систем рамноліпідного біокомплексу з неіоногенним ПАР Твін-80, Встановлено, що у водних розчинах сумішей ПАР Твін-80 найменше впливає на поверхневу активність, а РБК – найбільше (рис. 5.6).



**Рис. 5.6.** Залежність поверхневого натягу розчинів Твін-80 (1), РБК (6), їх сумішей від загальної концентрації ПАР (вміст РБК у суміші: 2 – 11,1; 3 – 25,0; 4 – 42,9; 5 – 66,7 % (мас)).

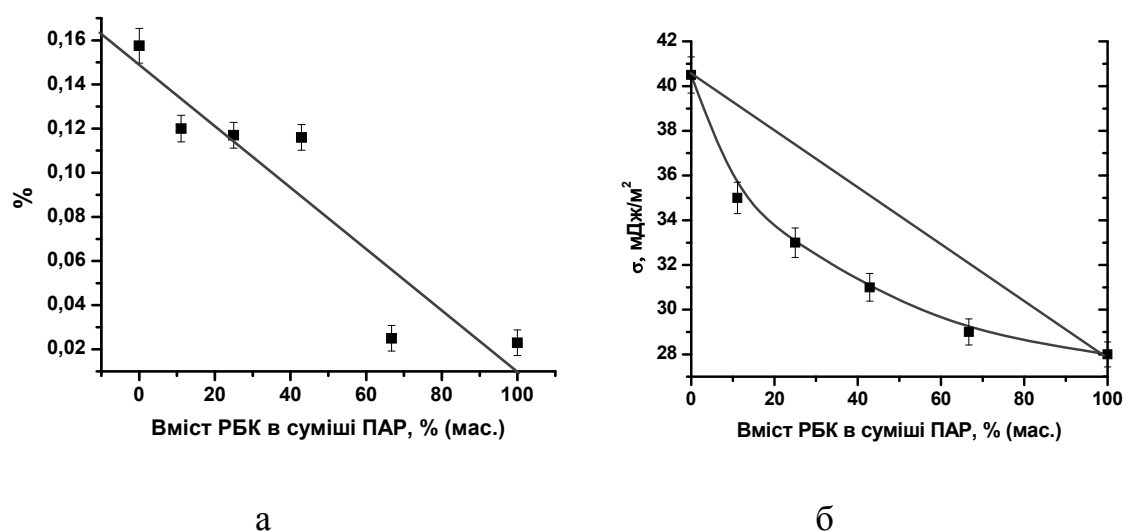
Вигляд залежностей поверхневого натягу від концентрацій є традиційним для колоїдних ПАР – ділянка стрімкого падіння поверхневого натягу та ділянка його незмінного значення за концентрацій, більших за ККМ. ККМ визначали за графіками залежності  $\sigma$  від  $\ln C$  (рис. 5.6 як для Твін-80 й РБК, так і для їх сумішей. На рис.5.7 наведено приклад визначення ККМ суміші, що містила 88,9 % мас. Твін-80 та 11,1 % мас. РБК.



**Рис. 5.7.** Визначення ККМ суміші з 88,9 % Твін-80 і 11,1 % РБК по залежності поверхневого натягу від логарифму концентрації

Далі вивчали залежність поверхневого натягу водних розчинів сумішей Твін-80 та РБК від вмісту останнього за концентрацій більших, близьких та менших за ККМ. Показано, що у всіх випадках значення поверхневого натягу суміші менші за адитивні величини, які відповідають ідеальній змішаній міцелі. Це свідчить, що у міцелах й у розчині між молекулами Твін-80 та компонентами РБК відбуваються міжмолекулярні взаємодії, енергія яких відмінна від енергій взаємодій між молекулами кожного окремого компонента. Це спричиняє збільшення концентрації активнішого ПАР (РБК) у поверхневому прошарку та більшу поверхневу активність суміші порівняно з ідеальною. За концентрацій,

менших за ККМ, спостерігаються залежності, аналогічні до вищих за ККМ, але у цьому випадку зменшення поверхневого натягу на межі з повітрям порівняно з ідеальним розчином відбувається без утворення міцел. Залежність ККМ від вмісту РБК задовільно описує лінійна залежність (коефіцієнт кореляції 0,92) (рис.5.8 а). Відхилення від лінійності можуть бути пов'язані з особливостями формування змішаних міцел.



**Рис. 5.8. Залежності ККМ (а) і поверхневого натягу (б) від вмісту РБК (%) у водних розчинах сумішей ПАР (загальна концентрація ПАР 10 г/дм<sup>3</sup>)**

Натомість залежність мінімального поверхневого натягу від вмісту РБК у сумішах (за найвищої концентрації ПАР) описує експоненціальна залежність з коефіцієнтом кореляції 0,99 (рис. 5.8 б). Це вказує на усталеність міжмолекулярних взаємодій між Твін-80 і РБК в міцелах й у поверхневому прошарку за таких концентрацій й підтверджує висновок про збільшення вмісту РБК у поверхневому шарі на межі з повітрям щодо загального об'єму розчину.

Для оцінювання можливості практичного застосування визначеної нелінійної залежності поверхневого натягу від складу водних розчинів сумішей ПАР досліджували емульгувальну активність (індекс емульгування і стійкість

емульсій ПАР з соняшниковою олією). Соняшкову олію для дослідження емульгуювальної здатності ПАР було обрано в зв'язку з її практичним використанням у харчових, фармацевтичних та косметичних продуктах.

Дослідження емульгуювальної активності здійснювали для сумішей ПАР з різними співвідношеннями РБК і Твін-80 та за різних загальних концентрацій ПАР у розчинах (табл.5.5).

Таблиця 5.5.

**Емульгуювальна здатність сумішей Твін-80 та РБК з соняшниковою олією**

Концентрація ПАР, г/дм <sup>3</sup>		E <sub>24</sub> , %	E <sub>120</sub> , %
Тween-80	РБК		
3,4	6,6	40	40
1,0	2	41	38
0,5	1	50	49
0,25	0,5	27	25
6,0	4	17	5
3,0	2	45	43
1,5	1	44	43
0,75	0,5	40	40
7,5	2,5	45	44
3,0	1	44	42
1,5	0,5	40	39
2,0	0	43	40
1,0	0	50*	45
0,5	0	40	20
0,0	2	38	33
0,0	1	38	38
0,0	0,5	34	25

Примітки: E<sub>24</sub> - індекс емульгування у системі ПАР – соняшникова олія через 24 год, E<sub>120</sub>- індекс емульгування у системі ПАР – соняшникова олія через 120 год.

Встановлено, що найефективнішою емульгуювальною активністю володіють суміші при співвідношенні РБК і Твін-80 2:1 та за концентрації Твін-80 – 0,5 г/дм<sup>3</sup>, а РБК – 1 г/дм<sup>3</sup> (див. табл. 5.5). Отримані емульсії соняшкової олії з водною фазою були стабільними і через 5 діб.

Отже, досліджено колоїдно-хімічні властивості водних розчинів Твін-80 та РБК та показано, що від'ємні відхилення отриманих систем ПАР від ідеальної суміші (за всіх концентрацій Твін-80 та РБК) вказують на переважання вмісту РБК у поверхневому шарі відносно його вмісту у розчині. Причиною збільшення поверхневої активності сумішей Твін-80 й РБК порівняно з ідеальною сумішшю може бути зміна положення молекул у поверхневому шарі внаслідок міжмолекулярних взаємодій та насичення цього шару гідрофобними групами як рамноліпідного біокомплексу, так і Твін-80.

Таким чином, встановлено особливості колоїдно-хімічних характеристик змішаних систем рамноліпідного біокомплексу і Твін-80, що стали підґрунтям для створення нових ефективних біотехнологічних препаратів. Отримані результати відкривають перспективи використання сумішей ПАР за участю продуктів біотехнології у промисловості та в сільському господарстві.

### **5.3. Біологічні властивості рамноліпідних ПАР штамів *Pseudomonas***

***Регулювання проникності клітинних мембран*** із застосуванням ПАР. Відомо, що рамноліпіди, як біологічні сурфактанти сприяють підвищенню проникності клітинних мембран різних мікроорганізмів, в тому числі патогенних і, таким чином, впливають на ефективність антимікробних агентів, що зазвичай застосовуються. З іншого боку, ПАР можуть сприяти екскреції токсинів або впливати на периферичну структуру клітини, що приводить до зміни здатності до адгезії та вірулентності. Завдяки своєму впливу на проникність клітинних мембран, біоПАР можуть підвищувати ефективність біологічно активних речовин за використання у комплексних препаратах з антимікробними сполуками різної природи. Тому досліджували зміни проникності клітин, спричинені дією поверхнево-активних рамноліпідів та РБК.



Нами встановлено, що при обробці клітин ряду тестових мікроорганізмів різних таксономічних груп розчинами рамноліпідів та біокомплексу було досягнуто значне підвищення проникності клітинних мембран (таблиця 5.6). Для порівняння було вивчено вплив синтетичних ПАР на проникність мембран. Паралельно з дослідженням виходу білка з клітин після обробки розчинами різних поверхнево-активних речовин (збільшення кількості позаклітинного білка) визначали число живих клітин у дослідних зразках шляхом висіву на чашки Петрі. Результати аналізів свідчать, що кількість життєздатних клітин після обробки розчинами ПАР не корелює з додатковим вивільненням білка при застосуванні різних ПАР.

Так, при використанні натрій додецилсульфату (0,05%) визначено 50%-ве вивільнення білка, що спричиняє антимікробний ефект (відсутність росту на твердому поживному середовищі). За вмісту ДДС 0,01% кількість білка зростала на 20 %, а чисельність живих клітин зменшилась у 100 разів. Тобто, цей аніоногенний ПАР спричиняє руйнування клітин і тому не може бути рекомендованим для регулювання проникності мікробних мембран.

Нейоногенний ПАР Твін-80 за вмісту  $>1\%$  збільшує кількість позаклітинного білка у 2 рази за контроль. При цьому спостерігається повна загибель клітин. При обробці клітин 0,5%-ним Твін-80 виходило на 50% більше білку, число життєздатних клітин зменшилося у 30 разів. При вмісті Твін-80 0,05% вихід білку зростав на 20% щодо контролю, число живих клітин зменшилося у 2 рази. При використанні рамноліпідів та біокомплексу за 0,1% (додатковий вихід білка – 50%) кількість клітин щодо контролю незмінна, а за вмісту цих ПАР 0,25 % (100%-ве додаткове вивільнення білка), число клітин знизилося удвічі.

Таблиця 5.6.

## Вплив рамноліпідних ПАР на вивільнення позаклітинного білка

Культури мікроорга- нізмів	Концен- трація ПАР, %	Вміст позаклітинного білку, % до контролю			
		РЛ	РБК	ДДС	Твін-80
1	2	3	4	5	6
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0,0001	110	115	103	102
	0,0005	109	113	101	128
	0,001	109	102	100	100
	0,005	111	127	114	114
	0,01	116	122	103	101
	0,05	125	121	138	124
	0,1	144	150	161	130
	0,25	200	200	164	136
	0,5	н.д.	н.д.	179	140
<i>Escherichia coli</i>	0,0001	122	114	109	121
	0,0005	127	126	115	100
	0,001	113	126	103	111
	0,005	121	131	113	106
	0,01	120	116	104	101
	0,05	126	112	150	142
	0,1	151	158	172	186
	0,25	200	200	189	192
	0,5	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,0001	112	117	100	102
	0,0005	123	122	103	108
	0,001	122	114	103	112
	0,005	128	135	108	118
	0,01	116	105	137	100
	0,05	122	104	180	135
	0,1	173	119	192	190
	0,25	200	186	н.д.	н.д.

Продовження таблиці 5.6.

1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus mesentericus</i>	0,0001	110	100	103	101
	0,0005	101	100	100	102
	0,001	100	100	122	100
	0,005	102	100	100	100
	0,01	109	100	101	100
	0,05	118	111	131	112
	0,1	175	145	160	132
	0,25	200	200	139	147
	0,5	н.д.	н.д.	159	160
<i>Mycobacterium luteum</i>	0,0001	100	100	100	100
	0,0005	100	100	100	103
	0,001	107	107	100	100
	0,005	100	109	100	100
	0,01	100	108	116	101
	0,05	120	106	156	144
	0,1	155	143	160	150
	0,25	200	200	183	176
	0,5	н.д.	н.д.	176	183
<i>Candida lipolytica</i>	0,0001	124	151	147	145
	0,0005	134	158	150	148
	0,001	162	150	156	151
	0,005	171	158	147	156
	0,01	177	158	140	140
	0,05	180	186	168	141
	0,1	200	200	192	175
	0,25	н.д.	н.д.	188	187
	0,5	н.д.	н.д.	н.д.	192

Примітка: н.д. – не досліджували. РЛ – рамноліпіди, РБК – рамноліпідний біокомплекс, ДДС – натрій додецил сульфат

Отже, рамноліпідні ПАР є активними регуляторами проникності клітинних мембран мікроорганізмів з «м'якою» дією за концентрації до 0,1 %

(вивільнення білка до 50%). Тобто рамноліпіди в таких концентраціях можна рекомендувати як ефективні пермеабілізатори клітинних мембран і використовувати в сільському господарстві, фармації, медицині та ветеринарії.

**Токсикологічні дослідження біоПАР.** Токсикологічні дослідження необхідні для визначення концентрацій біоПАР для застосовування у різних галузях промисловості і сільського господарства. Токсичність СКР, рамноліпідів, РБК визначали на тестових організмах *Daphnia magna*, аналізуючи кількість загиблих ракоподібних та клас токсичності проб. Дані смертності дафній наведені у таблиці 5.7.

Таблиця 5.7.

**Вплив концентрацій рамноліпідів, РБК і СКР *Pseudomonas* sp. PS-17  
на дафній**

Концентрація	Живі дафнії			
	1 доба	2 доба	3 доба	4 доба
Рамноліпіди, г/дм <sup>3</sup>				
0,001	8,6±0,6	8,6±0,6	8,3±0,6	8,3±0,6
0,01	8,3±0,6	8,3±0,6	8,3±0,6	8,3±0,6
0,05	6,6±0,6	6,6±0,6	6,3±0,4	6,3±0,4
0,1	6,3±0,4	6,3±0,4	5,3±0,4	5,3±0,4
0,2	2,6±0,6	2,3±0,4	1,3±0,4	0
РБК, г/дм <sup>3</sup>				
0,001	9±1	7,3±0,4	7,3±0,4	7,3±0,4
0,01	8,3±0,6	6,6±0,6	6,6±0,6	6,6±0,6
0,05	8,3±0,6	6,6±0,6	6,3±0,4	5,3±0,4
0,1	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
Культуральна рідина, розведення				
1:2	0	0	0	0
1:10	0	0	0	0
1:25	5,3±0,4	4,6±0,6	2,3±0,4	0
1:50	8,3±0,6	8,3±0,6	6,3±0,4	6,6±0,6
1:100	9,3±0,4	9,3±0,4	8,3±0,6	6,6±0,6
1:200	10	10	10	10
вода	10	10	10	10

Із таблиці 5.7 видно, що культуральна рідина у розведенні 1:50 не виявляє токсичної дії на дафній. Розчини РЛ (менше 0,1 г/дм<sup>3</sup>) теж належать мають аналогічну дію. Розчини РБК в концентраціях 0,01-0,05 г/ дм<sup>3</sup> не проявляють летальної токсичності. До середньо токсичних можна віднести розчини біокомплексу у концентраціях 0,1-0,2 г/ дм<sup>3</sup>.

Також досліджено інші поверхнево-активні продукти, зокрема, НОР, СКР та біокомплекс *P. fluorescens* 8573 (табл. 5.8).

Таблиця 5.8.

**Динаміка смертності *Daphnia magna* при дії різних об'ємних концентрацій досліджуваних біоПАР штаму *P. fluorescens* 8573**

Час дії, год	Живі <i>Daphnia magna</i> , % виживання							
	НОР, розведення			СКР <i>P. fluorescens</i> 8573, розведення			Біокомплекс, г/дм <sup>3</sup>	
Концентрація	1:32	1:16	1:8	1:70	1:35	1:20	0,75	0,15
24 год	0	0	36,7	37	100	100	0	0
48 год	0	17	87	37	100	100	0	0
72 год	0	100	100	47	100	100	0	53,3
96 год	0	100	100	77	100	100	0	100

Отже, НОР у розведеннях до 1:32 та біокомплекс штаму *P. fluorescens* 8573 у концентрації 0,075 г/дм<sup>3</sup> не виявляють гострої летальної токсичності щодо ракоподібних *Daphnia magna* STRAUS. Натомість препарат СКР штаму *P. fluorescens* 8573 за розведення його до 1:70 є слаботоксичною речовиною щодо досліджуваних тестових організмів.

## Висновки до розділу 5

Визначено високу активність рамноліпідних ПАР (поверхневий натяг 26,5-28,5 мН/м, ККМ дирамноліпиду 138 мг/л, емульгувальну здатність ( $E_{24}$  50-100%), високу стійкість піни – 50-90 %, ефективність змочування різних поверхонь (крайовий кут змочування листків герані прогрітими НОР 75°, а отриманими з охолодженням – 15-30°).

Рамноліпідні біоПАР впливають на проникність клітинних мембран різних мікроорганізмів.

Продукти штамів *Pseudomonas* є малотоксичними речовинами для планктонних ракоподібних *Daphnia magna* STRAUS.

Визначені фізико-хімічні й біологічні властивості рамноліпідних ПАР штамів роду *Pseudomonas* обумовлюють перспективність їх використання у різних галузях сучасної економіки.

## Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:

1. Підбір оптимальних екстрагентів біологічно активних сполук на основі принципу лінійності вільних енергій. Т. Я. Покинсьброд, О. В. Карпенко, Р. Г. Макітра, О. Я. Пальчикова, Н. В. Роговик, В. І. Роговик. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2008. № 622. С. 103-106

2. Kłosowska-Chomiczewska I.E., Mędrzycka K., Hallmann E., Karpenko E., Pokynbroda T., Macierzanka A., Jungnickel C. Rhamnolipid CMC prediction. *Journal of Colloid and Interface Science*. V. 488. 2017. P. 10-19.

3. Карпенко О.В., Волошинець В.А., Карпенко І.В., Семенюк І.В., Мідяна Г.Г., Покинсьброд Т.Я. Колоїдні характеристики водних систем рамноліпідного біокомплексу штаму *Pseudomonas sp.* PS-17 з TWEEN-80 та їх перспективи для біотехнології. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 6. С. 7-13

## РОЗДІЛ 6. ЗАСТОСУВАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ ШТАМІВ РОДУ *PSEUDOMONAS*

### 6.1. Антимікробні засоби з використанням ПАР штамів роду

#### *Pseudomonas*

Для визначення можливості застосування отриманих продуктів біосинтезу штамів роду *Pseudomonas* як антимікробних засобів вивчено їх активність щодо різноманітних бактерій і грибів, зокрема фітопатогенних мікроорганізмів (табл. 6.1).

Таблиця 6.1.

#### Антимікробна активність СКР штамів роду *Pseudomonas* щодо бактерій-фітопатогенів

Культури бактерій- фітопатогенів	СКР штам <i>P. aureofaciens</i> NB-1		СКР штам <i>P. fluorescens</i> 8573		СКР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	
	МІК, мкг/см <sup>3</sup>	МБК, мкг/см <sup>3</sup>	МІК, мкг/см <sup>3</sup>	МБК, мкг/см <sup>3</sup>	МІК, мкг/см <sup>3</sup>	МБК, мкг/см <sup>3</sup>
<i>C. michiganensis</i>	-	-	-	-	30	500
<i>A. tumefaciens</i>	62,5	250	125	2000	300	500
<i>P. syringae</i>	250	500	-	-	100	1000
<i>E. carotovora</i>	-	-	125	125	200	200
<i>X. campestris</i>	-	-	-	-	100	1000

Показано, що СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1 та *P. fluorescens* 8573 володіють антимікробною активністю, причому тільки *Clavibacter michiganensis* виявився нечутливим до ПАР обох культур. Фітопатоген *P. syringae* не чутливий до ПАР штамів *P. fluorescens* 8573, а *E. amylovora* – до СКР *P. aureofaciens* NB-1.

Також виявлено фунгіцидні властивості СКР досліджуваних штамів щодо грибів *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia cerealis* (табл 6.2). Максимальні зони затримки росту виявлені при використанні СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 та *P. fluorescens* 8573 – 2,7 см та 2,2 см (для *A. alternata*) та 3,2 см та 2,8 см (для *F. oxysporum*) відповідно.

Таблиця 6.2.

**Вплив СКР штамів *Pseudomonas* на гриби-фітопатогени**

Розведення СКР, рази	СКР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17	СКР <i>P. fluorescens</i> 8573	СКР <i>P. aureofaciens</i> NB-1
Зони затримки росту <i>Alternaria alternata</i> , см			
0	2,7±0,2	2,2±0,2	-
2	1,8±0,1	1,6±0,3	-
4	1,2±0,2	1,1±0,2	-
8	1,0±0,1	0,7±0,2	-
16	-	-	-
Зони затримки росту <i>Fusarium oxysporum</i> , см			
0	3,2±0,3	2,8±0,2	1,2±0,1
2	2,1±0,3	2,0±0,3	-
4	1,1±0,2	0,9±0,1	-
8	0,8±0,1	-	-
16	-	-	-
Зони затримки росту <i>Rhizoctonia cerealis</i> , см			
0	1±0,2	0,9±0,1	-
2	1±0,2	0,8±0,1	-
4	0,8±0,1	-	-
8	0,7±0,1	-	-
16	-	-	-

Примітка: усі показники дослідних варіантів вірогідно відмінні від контролю,  $p \leq 0,05$ .



Такі специфічні властивості ПАР штамів *Pseudomonas* можна використати у сільському господарстві для комплексних засобів захисту рослин від хвороб мікробного походження.

**Прогнозування біологічної активності за структурою рамноліпідів (за комп'ютерною програмою PASS)** дозволило теоретично визначити їх активність як потенційних біологічно активних субстанцій для фармації, ветеринарії. Виявлено, що РЛ можуть мати вазопротекторну, імуностимулюючу, протівірусну, антитромботичну, гепатопротекторну дію, бути інгібіторами низки ферментів, регуляторами проникності мембран, антагоністами холестерину. Одержані результати дають змогу рекомендувати використання рамноліпідних ПАР для створення ефективних препаратів нового покоління. Їх перспективи пов'язані також з детергентною дією і водночас, низькою токсичністю. Деякі з цих прогнозів підтверджено експериментальними даними.

## **6.2. Використання продуктів штамів роду *Pseudomonas* при вирощуванні рослин**

Створення безпечних засобів для рослин є актуальним завданням біотехнології. Зважаючи на антимікробні, поверхнево-активні властивості рамноліпідних ПАР, вони дозволяють не тільки підсилити дію антимікробних субстанцій, знизити дозу біоцидів, а й покращити екологічну ситуацію. Досліджено вплив ПАР штамів роду *Pseudomonas* – *P. aureofaciens* NB-1, *P. fluorescens* 8573 та *Pseudomonas* sp. PS-17 на ріст ріпака (*Brassica napus*) та пшениці озимої (*Triticum aestivum* L). Показано, що СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 значно стимулює ріст цих рослин, так, за обробки насіння препаратом СКР (1:200) маса кореневої і надземної частини ріпаку збільшилась на 19 і 17% відповідно, а пшениці - на 15,6 і 34,8 % відповідно, схожість насіння пшениці –

на 18 %. За дії СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1 і *P. fluorescens* 8573 надземна частина ріпаку зросла на 11-15% щодо контролю. За всіх розведень СКР штамів *P. aureofaciens* NB1 і *P. fluorescens* 8573 спостерігалось зростання маси надземної частини пшениці на 8-15% щодо контролю, а з СКР *P. aureofaciens* NB1 (1:50) й маса кореня збільшилась на 18%. Досліджено вплив замочування насіння в розчинах РБК ( $0,01 \text{ г/дм}^3$ ). Приріст кореня редиски збільшується на 6%, а довжини пагона на 32%. Також встановлено ефективність отриманих ПАР при вкоріненні живців буряка столового: найбільший ефект виявлено при замочуванні у розчинах РБК ( $0,01 \text{ г/дм}^3$ ) – укорінюваність була на 70% вищою від контролю (вода).

Визначено також потенціал для сільського господарства економічно вигідного продукту – надосадової рідини НОР. У першу чергу вивчено їх фітотоксичний ефект відносно крес-салату (*Lepidium sativum*) (табл.6.3, рис.6.1).



**Рис. 6.1. Морфометричні показники крес-салату (4 доба) за замочування у 1- воді, 2- НОР (1:200), 3- НОР (1:150), 4- НОР (1:100), 5- НОР (1:50), 6- НОР (1:25), 7- НОР (1:10), 8-НОР (1:5).**

Таблиця 6.3.

Вплив надосадової рідини (після осадження РБК) штаму *Pseudomonas* sp.

## PS-17 на ріст крес-салату

Розведення НОР	Проростання, %	4 доби		9 діб		16 діб	
		стебло, см	корінь, см	стебло, см	корінь, см	стебло, см	корінь, см
Вода	98	2,64±0,15	4,31±0,14	4,16±0,13	7,72±0,16	6,11±0,14	9,10±0,14
1:150	98	2,78±0,13	5,08±0,14	4,18±0,15	7,36±0,16	6,13±0,18	9,12±0,18
1:100	98	2,76±0,13	5,06±0,13	4,66±0,16	7,38±0,18	6,64±0,19	9,55±0,18
1:50	98	2,79±0,14	4,38±0,15	5,02±0,18	7,62±0,19	6,12±0,18	11,09±0,17
1:25	98	3,12±0,15	3,84±0,13	5,42±0,16	6,84±0,17	6,21±0,19	10,08±0,17
1:10	97	2,94±0,15	3,14±0,14	5,46±0,18	6,54±0,15	6,31±0,17	11,52±0,19*
1:5	84	1,58±0,13	0,86±0,11	3,16±0,17	2,78±0,18	5,02±0,18	5,31±0,18
1:1	76	0	0	0	0	0	0
Без розведення	0	0	0	0	0	0	0

Примітка: усі показники дослідних варіантів вірогідно відмінні від контролю, \* –  $p \leq 0,05$ .

Показано, що надосадові рідини за розведень в 10 разів і більше не тільки не проявляють фітотоксичності, а й стимулюють ріст крес-салату – на 4-у добу приріст стебла був на 9-18% вище контролю (насіння без обробки). Схожий ефект спостерігався й у динаміці – на 9 та 16 доби експериментів (рис. 6.2).

Тобто, надосадові рідини є ефективними емульгаторами соняшникової олії та змочувальними агентами гідрофобних речовин. Надосадові рідини, отримані після осадження рамноліпідів можна застосовувати у екологічно-чистих технологіях у сільському господарстві, для рекультивації забруднених

ґрунтів, у композиційних мийних засобах та ін. Також, вони не проявляють фітотоксичного ефекту щодо крес-салату у десятикратному та більших розведеннях. Таким чином, можна безвідходно використати постферментаційну культуральну рідину та суттєво здешевити біоПАР за рахунок відсутності стадії їх екстрагування. Встановлено, що рамноліпідні ПАР штамів *Pseudomonas* є регуляторами росту і фізіологічних процесів рослин. Досліджено вплив продуктів біосинтезу штамів *P. aureofaciens* NB-1 (КР, СКР), та *Pseudomonas sp.* PS-17 (НОР, РБК) на ріст кукурудзи (*Zea mays*) (рис. 6.2, 6.3).



**Рис. 6.2. Вплив ПАР *P. aureofaciens* NB-1 на ріст кукурудзи: 1-контроль (вода), 2- ІОК (0,02 г/дм<sup>3</sup>), 3-КР (1:100:), 4-СКР (1:100:).**

Показано, що при замочуванні насіння кукурудзи у розчинах ПАР збільшується довжина пагона порівняно з контролем – на 20% та 33% при обробці КР та СКР *P. aureofaciens* NB-1 відповідно (насіння, замочене у воді) (рис. 6.2, табл. 6.4). При передпосівному замочуванні насіння кукурудзи у

розчинах НОР та РБК штаму *Pseudomonas* пагін збільшувався на 26% і 51% відповідно у порівнянні з контролем (рис. 6.3, табл. 6.4).



**Рис. 6.3. Вплив рамноліпідних ПАР на ріст кукурудзи: 1-контроль (вода), 2-НОР *Pseudomonas* sp. PS-17 (1:25), 3-РБК (0,01 г/дм<sup>3</sup>)**

За передпосівного оброблення насіння кукурудзи розчинами надосадової рідини та рамноліпідного біокомплексу спостерігалось також і збільшення довжини кореневої системи, але її приріст був дещо меншим – 16% та 20% відповідно.

При порівнянні сухої маси пагонів та коренів кукурудзи дослідних і контрольного варіантів відмічено їх приріст за впливу досліджених продуктів. Найефективнішими виявилось замочування кукурудзи в розчинах НОР (приріст пагона зріс на 55%) та РБК – пагін збільшувався вдвічі порівняно з контролем. Щодо кореня – у варіантах із використанням препарату КР штаму *P.*



*aureofaciens* NB-1, НОР та РБК штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 приріст становив близько 60 % (табл. 6.4.).

Таблиця 6.4.

**Морфометричні показники кукурудзи за її замочування у розчинах ПАР**

Варіант оброблення	Проростання, %	Довжина, см		Маса, г	
		стебло	корінь	стебло	корінь
Вода	90	2,27±0,15	1,19±0,14	0,15±0,03	0,58±0,06
КР <i>P. aureofaciens</i> NB-1 (1:100)	92	2,71±0,13	1,27±0,14	0,21±0,05	0,96±0,06
СКР <i>P. aureofaciens</i> NB-1 (1:100)	89	3,03±0,13	1,16±0,13	0,21±0,06	0,66±0,08
НОР (1:25)	98	2,88±0,14	1,39±0,15	0,23±0,08	0,93±0,09
РБК (0,01 г/дм <sup>3</sup> )	98	3,34±0,15	1,43±0,13	0,34±0,06	0,94±0,07
ІОК 0,02 г/дм <sup>3</sup>	94	2,51±0,15	1,14±0,14	0,21±0,08	0,79±0,05

Примітки: ІОК – індолілоцтова кислота; НОР – надосадова рідина; РБК – рамноліпідний біокомплекс.

Отже, ПАР штамів *Pseudomonas* – НОР (1:25) і РБК (0,01г/дм<sup>3</sup>) можуть бути ефективними засобами для передпосівного оброблення насіння.

Для визначення ефективності дії біоПАР як засобів захисту рослин проводили дрібноділянкові дослідження ефективності укорінення буряка столового. Для цього 30-денні живці попередньо замочували у підготованих розчинах рамноліпідного біокомплексу (0,01 г/дм<sup>3</sup>) та висаджували на дослідні ділянки. Результати експерименту наведені у таблиці 6.5.

Таблиця 6.5.

**Вплив рамноліпідного біокомплексу (РБК) на укорінення буряка  
столового (*Beta vulgaris*)**

Варіант	Ефективність укорінення, %
Контроль	45
Рамноліпідний біокомплекс (0,01 г/дм <sup>3</sup> )	70

Показано, що при замочуванні саджанців у розчинах РБК ефективність вкорінення зростає на 55% порівняно з контролем.

***Використання рамноліпідних ПАР у композиційних біодобривах.***

Екологічно безпечні біодобрива на основі азотфіксаторів мають переваги перед мінеральними для органічного сільського господарства, проте часто вони є недостатньо стабільними. Показано стимулювальний вплив рамноліпідних ПАР на ефективність азотфіксувальних бактеріальних препаратів та запропоновано композиційні біодобрива на основі азототфіксаторів з рамноліпідними біоПАР для вирощування бобових та злакових рослин.

Для встановлення впливу біоПАР на ефективність біодобрив на основі симбіотичних і асоціативних азотфіксаторів насіння рослин обробляли біопрепаратами азотфіксаторів, до яких додавали РБК (0,05 і 0,01 г/дм<sup>3</sup>) або його додавали при вирощуванні бактерій (табл. 6.6). Це дало змогу підвищити ефективність дії досліджених азотфіксаторів.

Таблиця 6.6.

**Комплексне використання азотфіксатора *Sinorhizobium meliloti* ЛН11 та рамноліпідного біокомплексу при вирощуванні люцерни сорту Роксолана**

Варіанти оброблення насіння	Утворення бульбочок, шт/10 рослин	Маса коріння, г/10 рослин	Маса надземна, г/10 рослин
Контроль (вода)	0	0,14±0,05	0,21±0,02
Рамноліпідний біокомплекс	0	0,14±0,02	0,21±0,03
<i>S. meliloti</i> ЛН11	86±4	0,14±0,06	0,23±0,03
<i>S. meliloti</i> ЛН11+ рамноліпідний біокомплекс	112±7	0,15±0,07	0,25±0,04

Примітки: насіння обробляли розчинами рамноліпідів за концентрації 0,01 г/дм<sup>3</sup>; n= 12; усі показники дослідних варіантів вірогідно відмінні від контролю (p<0,05).

Встановлено, що оброблення насіння люцерни розчином РБК мало впливало на бульбочкоутворення, масу надземної і кореневої частини. За оброблення насіння культурою *S. meliloti* ЛН11 після дії РБК підвищувалася нодуляційна активність (кількість бульбочок) на 30,2%, а також коренева та надземна маса люцерни.

Для визначення впливу біоПАР на ефективність *Enterobacter* sp. для вирощування ячменю ярого сорту Княжий насіння обробляли сумішшю культури азотфіксаторів та розчинів РБК (0,05 і 0,01 г/дм<sup>3</sup>) або РБК додавали при культивуванні бактерій (табл. 6.7).



Таблиця 6.7.

**Використання рамноліпідного біокомплексу з культурою *Enterobacter* sp.  
для вирощування ячменю ярого сорту Княжий**

Препарати для оброблення насіння	Суха маса надземної частини, г/рослина	Суха маса кореневої частини, г/рослина
Контроль (вода)	0,19±0,01	0,09±0,01
<i>Enterobacter</i> sp.	0,22±0,01	0,10±0,02
РБК (0,05 г/дм <sup>3</sup> )	0,24±0,02	0,12±0,02
РБК (0,01 г/дм <sup>3</sup> )	0,24±0,01	0,121±0,02
<i>Enterobacter</i> sp. + РБК (0,05 г/дм <sup>3</sup> )	0,29±0,02	0,129±0,02
<i>Enterobacter</i> sp. + РБК (0,01 г/дм <sup>3</sup> )	0,27±0,02	0,124±0,03

Примітка. n= 26; показники вірогідно відмінні від контролю (p<0,05).

Було встановлено збільшення ефективності біодобрива на основі *Enterobacter* sp. під дією РБК: за оброблення насіння ячменю біопрепаратом *Enterobacter* sp. +РБК (0,05 г/дм<sup>3</sup>) маса надземної частини підвищилася на 23%, а кореневої – на 24 %, ніж у варіанті без додавання РБК.

Також оцінювалось практичне застосування композицій біоПАР з синтетичними. Встановлено, що змішані поверхнево-активні системи рамноліпідного біокомплексу з Твін-80 впливають на проростання насіння соняшника та його ростові (морфометричні) показники (при передпосівному обробленні насіння розчинами цих ПАР) (табл. 6.8).

Таблиця 6.8.

**Вплив передпосівного оброблення насіння соняшника розчинами сумішей  
Твін-80 і РБК на схожість і ростові показники**

Варіанти	Схожість %	Пагін		Корінь	
		Довжина см	Маса, г	Довжина, см	Маса, г
Контроль	57	3,81±0,19	0,27±0,01	7,69±0,38	0,55±0,02
Твін-80, 0,16 г/дм <sup>3</sup>	53	3,74±0,21	0,29±0,01	7,33±0,43	0,48±0,02
Твін-80, 0,78 г/дм <sup>3</sup>	56	3,90±0,15	0,26±0,01	7,71±0,38	0,50±0,03
РБК 0,019 г/ дм <sup>3</sup>	82	4,38±0,24	0,31±0,01	8,67±0,52	0,65±0,03
РБК: Твін-80 66,7:33,3 (0,02 г/дм <sup>3</sup> РБК)	93	5,73±0,22	0,34±0,02	10,86±0,43	0,81±0,04
РБК: Твін-80 66,7:33,3 (0,01 г/дм <sup>3</sup> РБК)	86	5,53±0,23	0,38±0,02	9,47±0,47	0,73±0,03
РБК: Твін-80 42,9:57,1 (0,08 г/дм <sup>3</sup> РБК)	89	5,06±0,25	0,38±0,02	9,65±0,57	0,73±0,04
РБК: Твін-80 42,9:57,1 (0,04 г/дм <sup>3</sup> РБК)	86	4,99±0,25	0,35±0,02	8,91±0,35	0,71±0,02

Виявлено, що оптимальним співвідношенням ПАР у системі рамноліпідний біокомплекс – Твін-80 по впливу на ростові показники соняшника та на емульгування соняшникової олії є 66,7:33,3, що відповідає концентрації РБК у суміші 0,02 г/дм<sup>3</sup>.

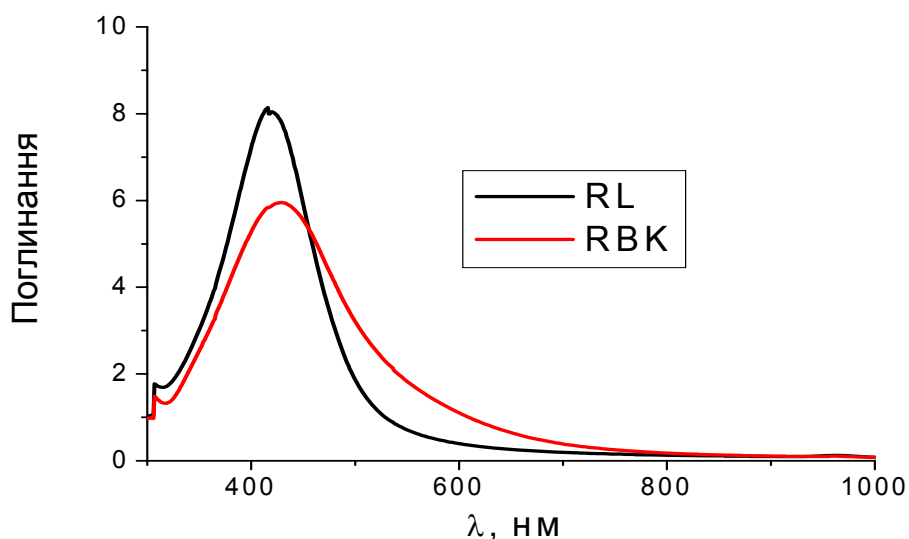
Також біогенні і синтетичні ПАР здатні підсилювати дію різних речовин, що обумовлює їх використання, зокрема у композиціях для регуляції росту і захисту рослин. Встановлено, що розроблені змішані системи РБК з Твін-80 впливають на ріст соняшника (при передпосівній обробці насіння їх розчинами). Встановлено, що суміш РБК–Твін-80 за співвідношення 2:1 є найефективнішою як за впливом на соняшник, так і для емульгування олії. Натомість для оброблення насіння ефективнішим є вміст РБК 0,02 г/дм<sup>3</sup>, а для емульгування – 1 г/дм<sup>3</sup>.

Різний концентраційний вплив ПАР на ці процеси пов'язаний їх механізмами дії: проникність рослинних мембран регулюється малими кількостями ПАР, а для емульгування потрібні вищі. Отже, рамноліпідні ПАР можуть бути використані як окремо, так і у комплексних агропрепаратах, сприяючи врожайності, якісній продукції, збереженню родючості ґрунтів.

### **6.3. Синтез наночастинок срібла із використанням рамноліпідних ПАР штамів *Pseudomonas***

Новим напрямком застосування рамноліпідних ПАР є «зелений» синтез наночастинок срібла. Синтезовано стабільні нанорозмірні частинки із застосуванням рамноліпідів і рамноліпідного біокомплексу, які виконують роль як редукуючих агентів, так і стабілізаторів завдяки їх поліфункціональності. Доведено утворення стійких AgNP-вмісних солей методом УФ/Віз-спектроскопії та за допомогою хлоридного тесту – спостерігалось 100% перетворення іонів Ag<sup>+</sup>. Завдяки своїй поліфункціональній природі, біоПАР можуть виконувати роль як відновників іонів срібла, так і стабілізаторів AgNP. Тому вивчена можливість отримання колоїдних розчинів AgNP в присутності БіоПАР для їх використання як антимікробних препаратів.

AgNP синтезовані згідно з методикою (Розділ 2). Як комбіновані агенти-прекурсори (відновники і стабілізатори) використані РЛ і РБК за концентрацій 1 г/дм<sup>3</sup>. Одержані колоїдні розчини срібла досліджені з використанням УФ/Віз-спектроскопії (рис. 6.4).



**Рис. 6.4. Спектри поглинання золів срібла, отриманих в присутності РЛ(-) і РБК(-)**

Як видно з даних рис. 6.4., максимум поглинання, а також ширина смуги поверхневого плазмонного резонансу (ППР) AgNP, отриманих в присутності РБК, є дещо більшими порівняно з отриманими за присутності РЛ, що вказує на вищі значення середнього діаметру і полідисперсності частинок. Значення середнього діаметру AgNP становлять 40 і 50 нм для наночастинок, модифікованих РЛ і РБК відповідно [223].

Антимікробну активність отриманих препаратів оцінювали за значеннями мінімальної інгібувальної концентрації та мінімальної бактерицидної концентрації (табл. 6.9).

Таблиця 6.9.

**Антимікробна активність препаратів на основі біоПАР та  
наночастинок срібла відносно *Agrobacterium tumefaciens***

	Рамноліпіди, 1 г/дм <sup>3</sup>		РБК, 1 г/дм <sup>3</sup>		Рамноліпіди 1 г/дм <sup>3</sup> + AgNP 0,1 М		РБК, 1 г/дм <sup>3</sup> + AgNP 0,1 М	
	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК
Розведення	1:50	1:25	1:100	1:50	1:200	1:100	1:800	1:400

Виявлено, що AgNP, модифіковані РБК, володіють значно вищою антимікробною активністю щодо фітопатогена *Agrobacterium tumefaciens*, ніж AgNP, модифіковані РЛ.

Даний факт, імовірно, можна пояснити кращою спорідненістю РБК до клітинної мембрани, що, відповідно, сприяє кращій взаємодії AgNP з мікроорганізмом.

#### 6.4. ПАР штамів роду *Pseudomonas* як інгібітори корозії металів

На основі раніше проведених досліджень показано, що РБК є ефективним інгібітором корозії алюмінієвого сплаву. Цікаво було дослідити вплив й інших біоПАР на корозію металів. Тому проаналізовано вплив ПАР штамів *Pseudomonas* на корозію пластин вуглецевої сталі Ст3, що широко використовується в народному господарстві для виготовлення металоконструкцій та технологічного обладнання.

Отримано та проаналізовано фізико-хімічні властивості таких продуктів біосинтезу *Pseudomonas sp.* PS-17 та *P. fluorescens* 8573 – СКР, НОР, а також СКР *P. aureofaciens* NB-1, вирощені на гліцерині або соєвій олії (див. табл.3.1.)

Інгібувальні композиції готували основі СКР *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1, а також НОР *Pseudomonas* sp. PS-17 та *P. fluorescens* 8573 та оцінювали їх вплив на корозію сталевих пластинок в агресивних середовищах з 0,1 % NaCl. В якості контролю використовували 0,1 % NaCl (неінгібоване середовище) (табл.6.10.).

Таблиця 6.10.

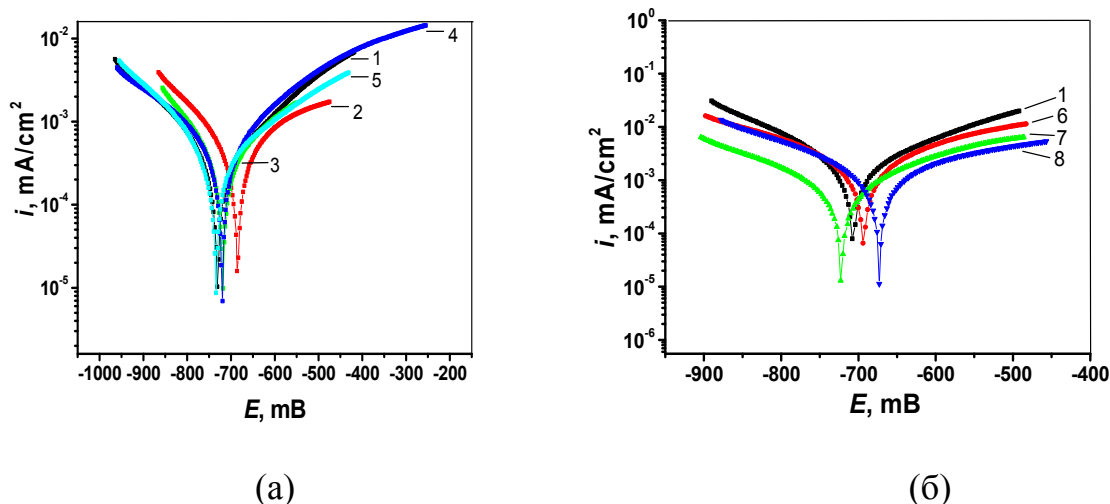
**Вплив СКР і НОР штамів *P. fluorescens* 8573, *P. aureofaciens* NB-1, *Pseudomonas* sp. PS-17 на корозію сталевих пластинок в середовищі 0,1 % NaCl**

№	Інгібувальна композиція		Швидкість корозії, $K_m \times 10^6$ , г/см <sup>2</sup> ·год	Ступінь захисту, %	Глибинний показник швидк. корозії, П мм/рік
	Поверхнево-активний продукт штаму	Розведення			
1	Неінгібоване середовище		9,5	-	0,12
2	СКР <i>P. fluorescens</i> 8573, (гліцерин)	1:5	1,85	81	0,023
3		1:10	2,7	72	0,034
4		1:25	5,14	47	0,065
5		1:50	5,7	41	0,064
6		1:75	5,7	41	0,064
7	СКР <i>P. aureofaciens</i> NB-1, (гліцерин)	1:5	0,44	95	0,0056
8		1:10	1,6	83	0,021
9		1:25	8,05	17	0,102
10		1:50	8,08	16	0,102
11		1:75	7,84	19	0,099
12	НОР <i>P. fluorescens</i> 8573, (гліцерин)	1:1	1,01	88	0,013
13		1:3	0,74	91	0,0094
14	НОР <i>P. fluorescens</i> 8573, (соєва олія)	1:1	3,67	59	0,047
15		1:3	4,68	48	0,059
16	НОР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17, (гліцерин)	1:1	1,01	88	0,013
17		1:3	1,05	88	0,013
18	НОР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17, (соєва олія)	1:1	1,84	79	0,023
19		1:3	1,68	81	0,021

Як видно з таблиці 6.10, препарати СКР штамів *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1 інгібують корозію сталі при їх розведеннях до 1:5 та 1:10 відповідно (ступінь захисту 80-95%). При дослідженні НОР обох штамів, культивованих на гліцерині, показано, що їх доцільно використовувати за розведень 1:3 (ступінь захисту – 88-91%). НОР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, отримана на соєвій олії також володіє антикорозійними властивостями (ступінь захисту – 79-81%).

Тобто, можна створювати ефективні інгібувальні композиції на основі СКР штамів *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1, а також НОР *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas* sp. PS-17 (в якості самостійних інгібіторів корозії сталі або як компонентів інгібувальних композицій) для технологій видобутку нафти і газу, для захисту обладнання хімічної промисловості, металовиробів при транспортуванні та зберіганні, у теплоенергетиці, в житлово-комунальному господарстві, у машинобудуванні.

Також встановлено здатність рамноліпідних ПАР інгібувати корозію сталі Ст3 у слабокислому дощовому розчині методом потенціодинамічної поляризації (рис.6.5). Визначено, що електрохімічна корозія у водних розчинах ПАР протікає при змішаному контролі зі зсувом потенціалу корозії  $E_{cor}$  у бік позитивних значень порівняно з неінгібованим середовищем. Так, у розчинах СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1 та *P. fluorescens* 8573 зафіксовано зменшення величини струму корозії  $I_{cor}$ . Ефективність інгібування корозії у розчинах ПАР збільшувалася із ростом їх концентрації, приблизно до значень ККМ. Механізм інгібування корозії, ймовірно, полягає в адсорбції молекул ПАР на поверхні сплаву з утворенням бар'єрної плівки.



**Рис.6.5. Інгибування корозії сталі Ст 3 за даними потенціодинамічних поляризаційних залежностей за дії СКР штамів *P. aureofaciens* NB-1(а) та *P. fluorescens* 8573 (б) у розведеннях: 1 – контроль, 2 – 1:5, 3 – 1:10, 4 – 1:25, 5 – 1:50, 6 – 0,1 г/дм<sup>3</sup>, 7 – 0,25 г/дм<sup>3</sup>, 8 – 0,5 г/дм<sup>3</sup> (у слабокислому дощовому розчині).**

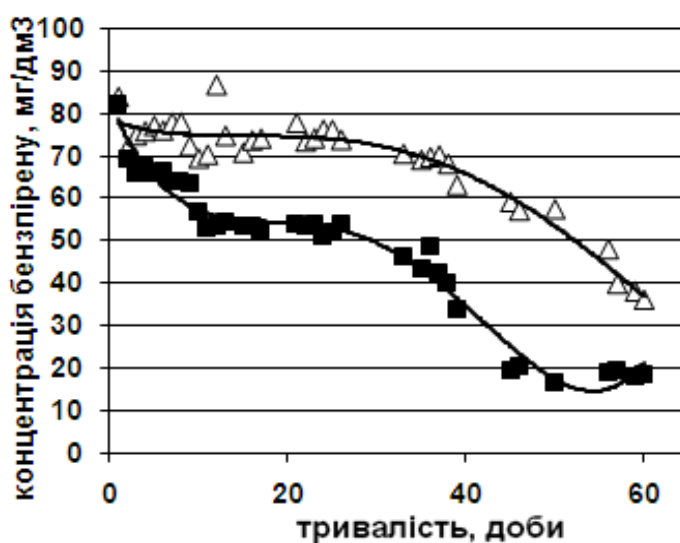
Отже, вперше показано можливість застосування ПАР штамів *P. aureofaciens* NB-1 та *P. fluorescens* 8573 для створення екологічно безпечних інгібіторів корозії металів.

### **6.5. ПАР штамів роду *Pseudomonas* для очищення ґрунтів і води від вуглеводневих забруднень**

Досліджено кінетику *деградації бензпірену* в присутності рамноліпідного біосурфактанту. Дослідження розкладу проводили з використанням мікроорганізмів та ґрунтового екстракту у таких комбінаціях: 100 мг/дм<sup>3</sup> ґрунтового екстракту бензпірену або 100 мг/ дм<sup>3</sup> ґрунтового екстракту бензпірену з додаванням 0,5 г/ дм<sup>3</sup> ґрунтового екстракту рамноліпідів.



Щоб перевірити вплив абіотичних процесів на ступінь розкладу бензпірену, одночасно провели дослідження з простерилізованим ґрунтовим екстрактом з такими ж комбінаціями (бензпірен та рамноліпіди додали після стерилізації). Бензпірен попередньо розчиняли в невеликій кількості метанолу. Дослідження вели в трьох паралельних повтореннях протягом 60 діб. Динаміка розкладу бензпірену у пробах з рамноліпідами та без них показана на рис. 6.6.



**Рис. 6.6. Динаміка розкладання бензпірену за дії рамноліпідів**  
(■ – з РЛ, Δ - без РЛ).

Криву розкладу бензпірену, що отримана на основі проведених експериментів, поділили на кілька частин в залежності від середніх швидкостей розкладу даного вуглеводню. Наприклад, з 1 по 7 день процесу середня хвилинна швидкість розкладу бензпірену без сурфактанту становила 0,419 мг бензпірену/добу, в той час як в пробах з рамноліпідом - 2,554 мг БП/добу. В другій фазі розкладу від 8 до 10 доби в пробах без сурфактанту середня швидкість становила 0,141 мг БП/добу, в той час як в другій фазі розкладу в пробах з ПАР (10-15 доба) - 0,53 мг БП/добу.

Третя фаза характеризується різким зменшенням швидкості розкладу як в пробах з сурфактантом, так і без нього (середня швидкість становила відповідно

0,065 мг БП/добу та 0,047 мг БП/добу. Цей період тривав до 21 доби в пробах без сурфактанту і до 22 доби з його додаванням. В четвертій фазі від 22 до 26 доби середня швидкість розкладу бензпірену в пробах з рамноліпідом була в 1,2 рази вища, ніж без сурфактанту і становила 0,22 мг БП/добу. П'ята фаза в пробах без сурфактанту тривала з 33 до 39 доби, а з сурфактантом – з 33 до 50. Середня швидкість розкладу в обох випадках була приблизно однакова - близько 0,83 мг БП/добу. В останньому етапі - 45-60 доба для проб без сурфактанту - швидкість розкладу становила близько 0,79 мг БП/добу, в той час як у пробах з рамноліпідом шостий етап припадав на 5 останніх діб процесу, протягом яких концентрація бензпірену практично не змінювалась.

Найінтенсивніший розклад бензпірену проходив у першому етапі досліджень. Потім швидкість розкладу зменшувалась до третього етапу, після чого повільно зростала до п'ятого.

Це явище можна пояснити тим, що біодоступну фракцію у ґрунті складають в основному речовини, що розчинені у водній фазі, а також ті, що слабо зв'язані з твердою фазою ґрунту, які протягом короткого часу можуть дифундувати і/або піддатись десорбції до ґрунтового екстракту. Вміст біодоступних фракцій не є постійним, а може змінюватись в часі, про що свідчать різноманітні біотичні та абіотичні процеси, яким піддаються забруднення в ґрунтовому середовищі. Причиною спаду біодеградації могло бути зниження активності зовнішньоклітинних ензимів, викликане їх розкладом, сорбцією чи денатурацією. Хроматографія ефірних екстрактів проб після біодеградації з рамноліпідом та без нього засвідчила наявність продуктів біотрансформації бензпірену, що флюоресцентні в УФ-світлі. Деякі з них мали фенольний характер, специфічно реагуючи з хлоридом заліза.

Відносно довгий термін повільного розкладу бензпірену скоріше за все є часом, необхідним для активації індукційних ензимів, що відповідають за його розклад. Додавання ліпиду до проб спричинило збільшення ступеню розкладу

цього вуглеводню на 18 % в порівнянні з пробами без нього. Після 60 діб біодеградації ступінь розкладу бензпірену складав відповідно близько 64% в пробах без сурфактанту і близько 82% в пробах з його додаванням.

В результаті досліджень визначено також, що розклад п'ятициклічного вуглеводню в біологічно неактивних пробах практично не проходив (ступінь розкладу становив близько 3% як у пробах з рамноліпідом, так і без нього). Висока стійкість бензпірену у стерилізованих ґрунтових екстрактах доводить, що його розклад проходить виключно біологічним шляхом.

**Ефективність застосування інтегрованих систем: глауконіти – біоПАР**, а також мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів для очистки забруднених ґрунтів. Проблема очистки і регенерації ґрунтів із застарілими нафтовими забрудненнями є надзвичайно складною та актуальною для підприємств нафтогазового комплексу з наступних причин. Значні концентрації забруднювачів у ґрунтах на об'єктах видобування, транспортування та переробки нафти. Сорбція забруднювачів на ґрунтах, що ускладнює процеси очистки, загроза забруднення для підземних вод, а також токсичний та мутагенний вплив на довкілля [224]. Розроблено способи очистки на реальних об'єктах – забруднених ґрунтах з промислової зони ВАТ НПК “Галичина”. В експериментах застосовувалися такі підходи: обробка забруднених взірців глауконіти та розчинами біоПАР (культуральна рідина, РБК), внесення активних штамів-продуцентів біоПАР та деструкторів вуглеводнів як стартових культур для біодеградації забруднень. Обрано наступні варіанти обробки ґрунтів: 1. КР *Pseudomonas* sp. PS-17+амоній нітрат. 2. КР *Pseudomonas* sp. PS-17+ глауконіт + амоній нітрат. 3. Змішана мікробна популяція деструкторів вуглеводнів + КР *Pseudomonas* sp. PS-17 (біоПАР) + амоній нітрат. 4. контроль (амоній нітрат).

В усі взірці було додано 0,3% амоній нітрату як джерела азотного живлення. Дослідні ґрунти аналізували через 35 діб на вміст нафтопродуктів за

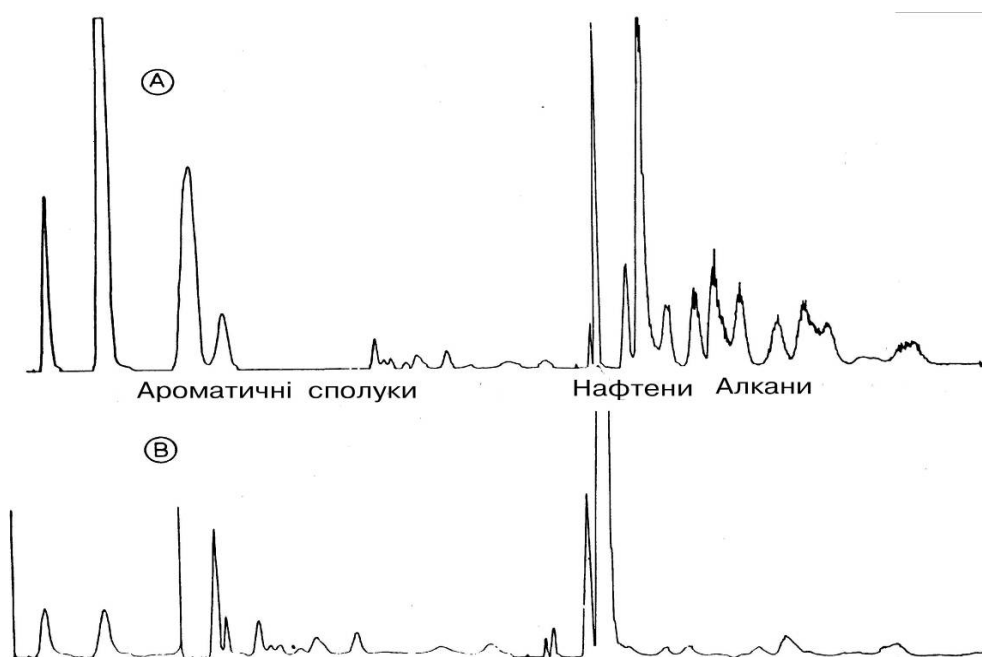
методом інфрачервоної спектроскопії з попереднім вилученням забруднювачів шляхом екстракції. Результати аналізів представлені у таблиці 6.11. Результати експериментів свідчать про те, що найкращий ефект дають комплексні підходи: 2 – глауконіти і КР *Pseudomonas* sp. PS-17 і 3 – КР *Pseudomonas* sp. PS-17 і змішана мікробна популяція. При цьому вміст забруднювачів знижується більше, ніж у 10 разів за 35 діб.

Таблиця 6.11.

**Деградація нафтопродуктів у ґрунтах в результаті комплексної  
очистки**

Варіант очистки	Вміст нафтопродуктів, мг/кг	
	35 діб	90 діб
КР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17) 0,3% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	90,1 $\pm$ 3,2	31,7 $\pm$ 1,6
КР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17 + глауконіт + 0,3% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	28,2 $\pm$ 1,2	16,8 $\pm$ 0,5
Мікроорганізми деструктори + КР <i>Pseudomonas</i> sp. PS-17 + 0,3% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	29,8 $\pm$ 1,5	12,3 $\pm$ 0,4
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	260,1 $\pm$ 4,4	157,3 $\pm$ 2,4
Вихідний забруднений ґрунт	330,2 $\pm$ 5,1	290,9 $\pm$ 2,9

Газохроматографічний профіль органічних екстрактів, наведений на рис.6.7, ілюструє зниження концентрацій окремих нафтових фракцій (ароматичні сполуки, нафтени і алкани) в результаті комплексної очистки ґрунтів.



**Рис.6.7. Газохроматографічний профіль органічного екстракту із забруднених нафтою ґрунтів до (А) і після (В) мікробної очистки**

Мікроорганізми-деструктори нафтових забруднень розкладають ці сполуки ступінчасто, через ряд проміжних продуктів мікробного метаболізму. В цілому баланс можливих реакцій можна представити таким рівнянням [225]:



де  $a(\text{CH}_2)$  – вуглеводень, що розщеплюється;

$d(\text{CH}_{1,92}\text{O}_{0,3}\text{N}_{0,24})$  – формула біомаси;

$f(\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z)$  – сумарні метаболіти та вода.

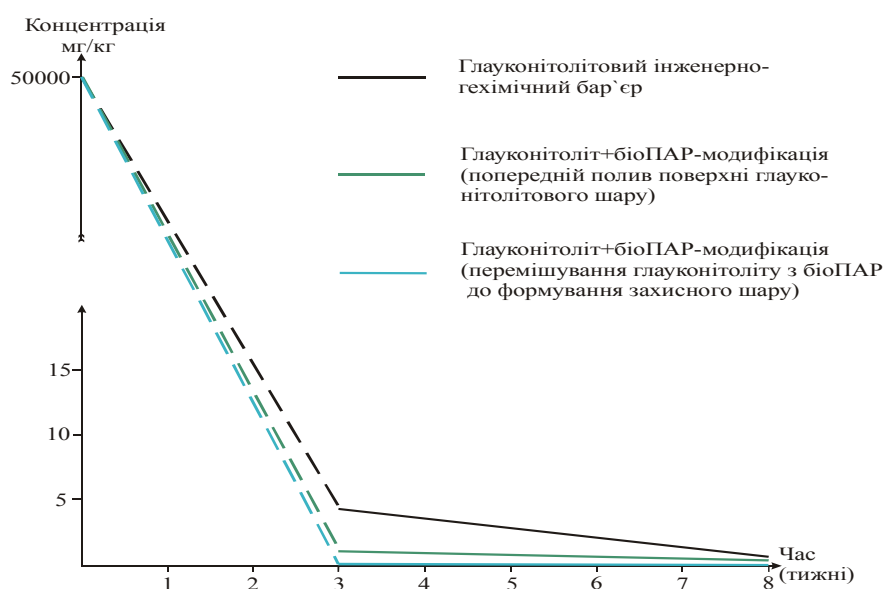
Кінцевими продуктами метаболізму у ґрунтах є:

-вуглекислота, що може зв'язуватись в карбонатах, вода;

-сполуки кисню (спирти, кислоти, альдегіди, кетони), що частково входять в ґрунтовий гумус, частково розчиняються у воді [226]

*Дослідження процесу функціонування інженерно-біогеохімічних бар'єрів в природних умовах.* Досліджено ефективність використання

інженерно-геохімічного та інженерно-біогеохімічного (глауконіт, попередньо оброблений біоПАР) бар'єрів: захисний тип (захист незабруднених ґрунтів) та для запобігання тривалому забрудненню поверхні ґрунту, яке може статись при аварійних розливах на місцевості. В якості забруднювачів використовувалась нафта, об'єм вилитого забруднювача на поверхню ґрунту та захисного бар'єру складав 5,0-5,5 г/кг, що перевищувало значення гранично допустимих концентрацій нафтопродуктів у ґрунтах більше ніж у 1600-1800 разів (ГДК у ґрунтах згідно складає 10-30 мг/кг). Експеримент тривав 8 тижнів. Проби для аналізу відбирались на контакті бар'єру, на поверхні ґрунту та на глибині 5 см. Динаміка зміни концентрацій забруднювачів на контакті глауконіт- ґрунт та ефективність захисної дії інженерно—(біо)геохімічного бар'єру приведені на рис.6.8.



**Рис.6.8. Ефективність захисної дії інженерно- (біо) геохімічних бар'єрів різних типів при нафтовому забрудненні ґрунту**

Аналізуючи ефективність дії різних типів бар'єрів за їх захисною дією та зростанням сорбційних можливостей глауконіту в системі глауконіт – біоПАР, встановлено наступні позитивні тенденції:

-застосування біоПАР суттєво підвищує ефективність інженерно-геохімічних бар'єрів, у яких використовують глауконіт;

-система глауконіт-біоПАР суттєво покращує сорбційні властивості глауконітів, розрахована на тривалу дію і не потребує заміни (утилізації) захисного шару.

Отже, обробка глауконіту біоПАР значною мірою покращує механізм дії глауконітового бар'єру за рахунок солюбілізації (емульгації) нафти та нафтопродуктів, здійснює більш рівномірний розподіл навантаження на захисний шар, а за рахунок деструкції забруднювачів призводить до регенерації сорбента. Проведені дослідження показали, що при застосуванні бар'єрів глауконітового типу або системи глауконіт-біоПАР можна в промислових масштабах здійснювати ефективний захист поверхні ґрунту від нафтового забруднення. При цьому виключається негативний вплив на довкілля, оскільки при конструкції бар'єрів застосовуються компоненти природного походження.

### Висновки до розділу 6

Встановлено, що рамноліпідні ПАР – продукти синтезу штамів *Pseudomonas* перспективні як антимікробні засоби, зокрема для сільського господарства.

Доведено перспективність застосування ПАР у рослинництві як регуляторів росту, для укорінення живців, що підтверджено експериментами в польових умовах – при передпосівному обробленні насіння надземна маса рослин зростає у середньому на 19 %, а коренева – на 30 % залежно від виду рослин та застосованих ПАР. Ефективними засобами для замочування насіння є НОР (1:25) та РБК (0,01г/дм<sup>3</sup>). Рамноліпідні ПАР перспективні для створення комбінованих біодобрих.

Показано, що отримані ПАР штамів *Pseudomonas* є ефективними для інтенсифікації очистки ґрунтів від нафтових вуглеводнів, в тому числі важкодеградабельних – підвищення ступеню розкладу бензпірену на 18 % щодо контролю. При застосуванні асоціації ґрунтових мікроорганізмів-деструкторів з культуральною рідиною *Pseudomonas* sp. PS-17 і глауконітовим сорбентом досягнуто зменшення вмісту нафтопродуктів на 90% протягом місяця та 97% протягом 3 місяців.

Рамноліпідні ПАР можна використовувати для створення екологічно безпечних інгібіторів корозії металів, зокрема сталі Ст3.

Вперше встановлено ефективність рамноліпідних ПАР для «зеленого» синтезу наночастинок.

**Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1. Покинсьброд Т. Я., Хом'як С. В., Швед О. В., Парашин Ж. Д., Комаровська-Порохнявець О. З., Карпенко О. В., Вільданова-Марцишин Р. І., Федоришин Ю. І., Наконечний М. В., Новіков В. П. Очистка ґрунтів від нафтових забруднень біотехнологічними шляхами. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2002. № 461. С. 208-211
2. Щеглова Н.С., Карпенко О. В., Покинсьброд Т.Я. Лубенець В.І., Швед О.В.. Гліколіпідні ПАР – екологічно безпечні стимулятори росту сільськогосподарських рослин. *Вісник НУ «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2007 №590. С.133-138
3. Малаховська-Ютш А., Покинсьброд Т., Карпенко Е. Деградація бензпирена ґрунтовими мікроорганізмами в присутстві гліколіпідів, синтезованих штаммом *Pseudomonas sp.* PS-17. *Біотехнологія*. 2007. № 3. С. 68 – 73
4. Karpenko E., Lisova N., Scheglova N., Vildanova R., Pokynbroda T., Hamkalo Z. The perspectives of using ecologically safe surfactants for agriculture. In: Development in production and use of new agrochemicals. *Chemistry for Agriculture. Edited by H.Gorecki, Zb. Dobrzanski, P. Kafarski. Chem-Pol Trade*. 2005. Vol.6. P. 786–793.
5. Патент України на корисну модель №36704 МПК А01N 25/30 А01N 59/06 А01N 63/00 С12N 1/20. Біопрепарат для бобових і злакових рослин. Лісова Н., Карпенко О. В., Щеглова Н.С., Вільданова-Марцишин Р.І., Покинсьброд Т.Я., Козуб Ю.Б., Галан М.С., Наконечний М.В.; заявник і власник Н. Ю. Лісова, О. В. Карпенко. – № u200804304; заявл. 07.04.2008; опубл. 10.11.2008, Бюл. №21.



## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі обґрунтовано і практично розв'язано важливе науково-технологічне завдання – розроблення біотехнології отримання поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, дослідження їх властивостей та визначення напрямків практичного застосуванні. Зокрема:

1. У результаті скринінгу знайдено нові продуценти поверхнево-активних речовин – штами *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1, які синтезують ПАР двох типів – рамноліпіди та ліпопептиди.

2. Встановлено доцільність застосування змішаних субстратів, рослинних олій, відходів виробництв для синтезу ПАР штамів *P. aureofaciens* NB-1, *P. fluorescens* 8573 і *Pseudomonas* sp. PS-17. Вихід ПАР на суміші гексадекан-гліцерин 1:6 зростав у 1,8 разів за скорочення тривалості синтезу на 3 доби. Оптимізовано умови синтезу ПАР на прикладі штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, підібрано склад інокуляційного та ферментаційного поживних середовищ (співвідношення C:N – 14:1 та 18:1 відповідно).

3. На основі експериментальних даних та математичного моделювання визначено оптимальні розчинники для екстракції ПАР штамів *Pseudomonas* (спирти та естери). Встановлено, що для виділення рамноліпідів штамів *Pseudomonas* sp. PS-17 та *P. fluorescens* 8573 доцільно використовувати кислотне осадження з нагріванням супернатанту культуральної рідини, що збільшує вихід рамноліпідного біокомплексу на 20%. При дослідженні впливу рН на екстракцію ПАР штаму *P. aureofaciens* NB-1 – найбільший вихід ліпідів (3,7 г/дм<sup>3</sup>) досягнуто за рН 11 за використання суміші етилацетату й ізопропанолу (2:1).

4. Раціональними формами цільових продуктів штамів *P. aureofaciens* NB-1, *P. fluorescens* 8573, *Pseudomonas* sp. PS-17 є культуральна рідина, супернатант культуральної рідини, рамноліпідний біокомплекс, рамноліпіди, надосадова рідина після осадження рамноліпідного біокомплексу, полігідроксиалконоати.

Розроблена технологія дозволила зменшити відходи постферментаційної культуральної рідини. Поряд з цим показано можливість практичного використання економічно вигідного продукту – надосадової рідини.

5. Визначено високу активність та низьку токсичність отриманих ПАР (поверхневий натяг 26,5-28,5 мН/м, ККМ дирамноліпиду 138 мг/дм<sup>3</sup>, емульгувальна здатність (E<sub>24</sub> 50-100%), піноутворення (стійкість піни 50-90%), змочування поверхонь), а також їх вплив на проникність клітинних мембран різних мікроорганізмів. ПАР штамів *Pseudomonas* мають антимікробну дію щодо низки фітопатогенних бактерій і грибів.

6. Доведено можливість практичного застосування компонентів постферментаційної культуральної рідини штамів *Pseudomonas*. БіоПАР є ефективними для інтенсифікації очищення ґрунтів від нафтових вуглеводнів, зокрема швидкість розкладу бензпірену зростала за дії рамноліпідів на 18%. Супернатанти культуральних рідин штамів *P. fluorescens* 8573 та *P. aureofaciens* NB-1 є екологічно безпечними інгібіторами корозії сталі Ст3 – ступінь захисту становить 80-95%. Вперше встановлено ефективність рамноліпідних ПАР для «зеленого» синтезу наночастинок (середній діаметр одержаних AgNP – 40-50 нм). Доведено перспективність застосування ПАР у рослинництві як регуляторів росту рослин (при передпосівному обробленні насіння надземна маса рослин зростає у середньому на 19%, а коренева – на 30%).

7. Розроблено технологію та запропоновано апаратурно-технологічну схему промислового виробництва ПАР штаму *P. fluorescens* 8573, особливостями якої є застосування ферментера з вихровою системою аерації. Дана технологія дозволяє одержати 5 цільових продуктів для практичного застосування та мінімізувати кількість відходів переробки культуральної рідини.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. C.N. Mulligan, S.K. Sharma and A. Mudhoo. Biosurfactants. Research Trends & Applications, Boca Raton: CRC Press, Taylor&Francis Group, 2014. 146 p.
2. H. Chong, Li. Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*. 2017.16:137.
3. Irerere V.U., Tripathi L., Marchant R., McClean S., Banat I. Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol.101. P. 3941-3951.
4. Jadhav J, Dutta S, Kale S, Pratap A. Fermentative production of rhamnolipid and purification by adsorption chromatography. *Prep Biochem Biotechnol.* 2018. Vol. 48(3). P.234-241.
5. Deleu M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids surfaces a: physicochem. Eng.aspects*.1999.Vol.152.P.3-10.
6. D.L. Gutnick, W. Minas. Perspectives on microbial surfactants. *Resources, conservation and Recycling*. 1996. Vol.18. P.41-57.
7. Desai J. Microbial surfactants: evaluation, types, production, and future applications. *J. of Sci. Indust. Resear.* 1987. Vol.46. P.440-449.
8. T.R. Shryock, S.A. Silver., J.C. Kramer. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on human neutrophil migration. *Current Microbiology*. 1984. Vol.10. P.323-328.
9. Rashedi H, Jamshidi E, Assadi M. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* from Iranian southern wells soil. *Int J Environ Sci Technol.* 2005. Vol. 2. P. 121-127.
10. Rashedi H., Mazaheri A., Jamshidi E. Optimization of the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* HR isolated from an Iranian southern oil well. *Iranian J Chem and Chemical Eng.* 2006. Vol. 25. P. 25-30.
11. Vasileva T., Galabova D., Stoimenova E. et al. Production and properties of biosurfactants from newly isolated *Pseudomonas fluorescens* HW-6 growing on hexadecane. *J Biosciences*. 2006. Vol. 61. P. 553-559.
12. Yin H., Xie D., Peng H. Study on the *Pseudomonas* XD-1 releasing biosurfactants. *Huanjing Kexue Xuebao*. 2005. Vol. 25. P. 220-225.

13. Y. Lang, L. Bian, S. Qin. Research Progress in Lipopeptide Biosurfactants. 3rd International Conference on Engineering Technology and Application. ICETA, 2016. P.1134-1139.
14. R. Eliora, E. Rosenberg. Natural roles of biosurfactants. *Env. Microbiology*. 2001. Vol.3(4). P.229–236.
15. T. H. Nielsen, J. Sorensen. Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Z.Naturforsch.* 2002. Vol. 11. P.53–55.
16. Wagner F. Strategies for biosurfactant production. *Fat. sci. Technol.* 1987. P.586-591.
17. D. Gutnick, W. Minas. Perspectives on microbial surfactants. *Resources, conservation and Recycling*. 1996. Vol.18. P.41-57.
18. L. Guerra-Santos, O. Kopeli, A. Fiechter. Process development for the production biosurfactants. Proc.3 Eur. Conf. Biotechnol. Munchen, Germany, 1984. P.79-83.
19. J. Andrä, J. Rademann, J. Howe. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biol Chem.* 2006. Vol. 387. P.301-310.
20. S. Häussler, M. Rohde, N. von Neuhoff. Structural and functional cellular changes induced by *Burkholderia pseudomallei* rhamnolipid. *Infect Immun.* 2003. Vol. 71(5). P.2970-2975.
21. N. Christova, B. Tuleva, Z. Lalchev. Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27 BN during growth on n-hexadecan. *Z Naturforsch.* 2004. Vol. 59 (1-2). P.70-74
22. N. Gunther, A. Nuñez, L. Fortis, D. Solaiman. Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006. Vol. 9. P.78-90.
23. N. Gunther, A. Nuñez, W. Fett, D. Solaiman. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 2005. Vol. 71 (5). P.2288-2293.

24. M. Rikalovi, G. Gojgi, M. Vrvic, I. Karadzic. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Serb. Chem. Soc.* 2012. Vol. 77 (1). P. 27–42.
25. A. Poli, P. Di Donato, G. Abbamondi, B. Nicolaus. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea*. 2011. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22007151>
26. J. Chee, S. Yoga, N. Lau, S. Ling, R.M.M. Abed. Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Formatex research center*. 2010. P. 1395-1404.
27. D.Y. Kim, H.W. Kim, M.G. Chung, Y.H. Rhee. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J. Microbiol.* 2007. Vol. 45. P. 87-97.
28. M. Zinn, B. Witholt, T. Egli. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 53 P. 5-21.
29. T. Ojumu, J. Yu, B. Solomon. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *Afr. J. Biotechnol.* 2004. Vol. 3. P. 18-24.
30. E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez. Polyhydroxyalkanoate (PHA ): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.* 2014. Vol.8. P. 791-808.
31. A. Padermshoke, Y. Katsumoto, H. Sato, S. Ekgasit, I. Noda, Y. Ozaki. Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Spectrochim. Acta. Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2005. Vol.61. P. 541-550.
32. Canet R., Birnstingl J.G., Malcolm D., Lopez-Real J.M., Beck A.J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresource Technology*. 2002. Vol. 76. P. 113–117.
33. M. Abouseouda, R. Maachi, A. Amranec. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 2008. Vol. 223. P. 143 – 151.

34. G. Pekin, F. Vardar-Sukan, N. Kosaric. Production of Sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. *Engineering in Life Sciences*. 2005. Vol. 5. P. 357 – 362.
35. P. Rahman, T. Rahman, S. McClean. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology Progress*. 2002. Vol. 18. P. 1277 – 1281.
36. S. George, K. Jayachandran. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Appl. Microbiology*. 2013. Vol. 114. P. 373 – 383.
37. N. Rocha e Silva, R. Rufino, J. M. Luna. Screening of *Pseudomonas species* for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014. Vol. 3. P. 132 – 139.
38. K. Dubey, A. Juwarkar. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. *Indian Journal of Biotechnology*. 2004. Vol. 3. P. 74 – 81.
39. G. Bhardwaj, S. Cameotra, H. K. Chopra. Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. *AMB Express*. 2013. Vol. 3. P. 1–5.
40. E. Haba, M. Espuny, M. Busquets. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000. Vol. 88. P. 379–387.
41. A. Abalos, A. Pinazo, M. Infante. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 2001. Vol. 17. P. 1367–1371.
42. Т. Пирог, А. Морозова, М. Кундеев. Использование промышленных отходов с целью получения поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. *Наукові праці: Одеська національна академія харчових технологій*. 2010. Т.2. №38. С.163-166.
43. K. V. Dubey, A. A. Juwarkar, S. K. Singh. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnology Progress*. 2005. Vol. 21. P. 860–867.
44. G. Silva, M. Mack, J. Contiero. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27. P. 30–39.

45. P.Amaral, T.Ferreira. Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and bioproducts processing*. 2009. Vol. 87. P. 179–186.
46. A. Pereira, G. Pacheco, L. Tavares, B. Neves, F. Kronemberger, R. Reis, D. Freire. Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. *Process Biochemistry*. 2013. 48.p. 1271–1278.
47. L. de Sousa, I. Dantas, A. Felix, B. de Sant'Ana, V. Melo and L. Gonçalves. Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Brazilian archives of biology and technology*. 2014. Vol. 57. №.2. P. 295-301.
48. Т. Пирог, М. Шуляков, Т. Шевчук. Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах. *Biotechnologia acta*. 2013. V.6. №6. С.28-44.
49. Kaskatepe B., Yildiz S., Gumustas M., Ozkan S. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* in kefir and fish meal. *Braz J Microbiol*. 2015. Vol. 46. P. 855–859.
50. Henkel M., Schmidberger A., Vogelbacher M., Kühnert C., Beuker J., Bernard T., Schwartz T., Syldatk C., Hausmann R. Kinetic modeling of rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 including cell density-dependent regulation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014. Vol. 98. P. 7013–7025.
51. Єрохін В.А., Карпенко О.В., Покин'яброда Т.Я., Лубенець В.І. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов мікробного синтезу поверхнево-активних речовин. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. 2008. № 609. С. 135-140.
52. E. Vasileva-Tonkova, D. Galabova, E. Karpenko, A. Shulga. Biosurfactant-rhamnolipid effects on yeast cells. *Lett Appl Microbiol*. 2001. Vol. 33 (4). P. 280-284.
53. D Spasova, D. Galabova. Yeast permeabilization as a tool for measurement of in situ enzyme activity: localization of alkaline phosphatase. *Z Naturforsch*. 1998. Vol. 53. P. 347-351.
54. M. A. Qazi, Z. A. Malik, G. D. Qureshi. Yeast Extract as the Most Preferable Substrate for Optimized Biosurfactant Production by rhlB Gene Positive *Pseudomonas putida* SOL-10 Isolate. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 2013. Vol. 4. P. 204 – 214.

55. S. Itoh, H. Honda, F. Tomita. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12,C13 and C14 fractions). *Journal of Antibiotics*. 1971. Vol. 24. P. 855 – 863.
56. C. S. Sylđatk, S. Lang, U. Matulovic. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* sp. DSM 2874. *Zeitschrift für Naturforschung*. 1985. Vol. 40. P. 61 – 67.
57. Y.-H. Wei, C.-L. Chou, J.-S. Chang Wei Y.-H. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*. 2005. Vol. 27. P. 146 – 154.
58. K. G. Clarke, P. C. Williams, M. S. Smith. Enhancement and repression of the volumetric oxygen transfer coefficient through hydrocarbon addition and its influence on oxygen transfer rate in stirred tank bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 2006. Vol. 28. P. 237 – 242.
59. Lang S, Wullbrandt D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999. Vol.51. P. 22–32.
60. C. Chayabutra, L. Ju. Polyhydroxyalkanoic acids and rhamnolipids are synthesized sequentially in hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Biotechnology Progress*. 2001. Vol. 17(3). P. 419–423.
61. K. Hori, S. Marsudi, H. Unno. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol Bioeng*. 2002. Vol. 78(6). P. 699–707.
62. J. Ahn, E.H. Jho, K. Nam. Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Environ. Eng. Res*. 2015. Vol. 20. P. 246-253.
63. Y.W. Cui, Y.P. Shi, X.Y. Gong. Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Adv*. 2017. Vol. 7, P. 18953-18961.
64. Hutabarat Supono, J. Prayitno, S.B. Darmanto Y. The effect of different C: N and C: P ratio of media on the content of polyhydroxybutyrate in biofloc inoculated with bacterium *Bacillus cereus*. *J. Coast. Dev*. 2013. Vol. 16. P. 114-120.



65. Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997. 61. P.47–64.
66. Beuker J, Steier A, Wittgens A, Rosenau F, Henkel M, Hausmann R. Integrated foam fractionation for heterologous rhamnolipid production with recombinant *Pseudomonas putida* in a bioreactor. *Amb Express.* 2016. 6:11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4747948>.
67. J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry.* 1957. Vol. 226. P. 497 – 509.
68. Т. П. Пирог, Т. А. Шевчук, А. Д. Конон, Е. Ю. Долотенко. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* k-4 на этаноле в присутствии органических кислот. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2012. 48. № 6. С. 631-639.
69. A. Singh, J.D. Van Hamme, O.P. Ward. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2 Applications aspects. *Biotechnology Advances.* 2007. Vol.25. P.99 – 121.
70. S. Mukherjee, P. Das, R. Sen. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology.* 2006. Vol.24. №11. P.90 – 97.
71. Pacwa–Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska–Seget, Z. and Cameotra, S.S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences.* 2011. Vol. 13. P. 633–654.
72. Banat I.M., Franzetti I.A., Gandolfi G., Bestetti M.G., Martinotti L., Fracchia T.J., Smyth R., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications. *Applied Microbiology Biotechnology.* 2010. Vol.87. P. 427–444.
73. Cortis J., Ghezzehei T.A. On the transport of emulsions in porous media. *J. Colloid and Interface Science.* 2007. Vol. 313. P. 1–4.
74. Van J.D., Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Surfactants in microbiology: Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances.* 2006. Vol.24. P. 604–620.
75. Parkinson M. Biosurfactants. *Biotechnology Advances.* 1985. Vol.3. P.65–83.

76. Bognolo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*. 1999. Vol.152. P. 41–52.
77. Deleu M., Paquot M. From renewable vegetables resources to microorganisms: New trends in surfactants. *Computers Rendus Chimie*. 2004. Vol.7. P. 641–646.
78. Lin S., Minton M., Sharma M., Georgiou G. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl Environ Microbiol*. 1994. Vol. 60. P.31-38.
79. Haytham M.M. Ibrahim. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2018. Vol. 27. Issue 1. P. 21-29.
80. Roy A. Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *J Fundam Renewable Energy Appl*. 2017. Vol. 8. P. 248.
81. Haba E., Pinazo A., Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR, Manresa A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng*. 2003. 5. Vol. 81(3). P. 316-322.
82. Y. Ruqiang, Y. Liu. Microstructure studies on biosurfactant-rhamnolipid/n-butanol/water/n-heptane microemulsion system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007. Vol. 292. Issues 2–3. P. 189-195.
83. Ozdemir G, Malayoglu U. Wetting characteristics of aqueous rhamnolipids solutions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2004. Vol. 25. №39 P. 1-7.
84. Helvacı S., Peker S, Ozdemir G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2004. Vol. 1. № 35. P. 225-33.
85. R. Al-Tahhan, T. Sandrin, A. Bodour. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 66. P. 3262 – 3268.

86. A. Sotirova, D. Spasova, E. Karpenko. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. *Current Microbiology*. 2008. Vol. 56. P. 639-644.
87. Сафарова Е. Р., Бакшеева С.С., Бурлаков В.А., Егоров В.В. Влияние ионогенных ПАВ на чувствительность *S. albus* и *E. coli* к пенициллину. *Вестн. моск. ун-та. Сер.2. Химия*. 2000. Т 41. №4. С. 277-278.
88. Lang S. E. Katsiwela, F. Wagner. Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Sci. Technol*. 1989. Vol. 9. P. 363-366.
- 89 E Haba, A Pinazo, O Jauregui. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng*. 2003. Vol. 5. №81 (3). P.316-322.
90. A Sotirova, D Spasova, D Galabova. Rhamnolipid-Biosurfactant Permeabilizing Effects on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains. *Curr Microbiol*. 2008. Vol. 11. P.214-217.
91. I M Helander, H L Alakomi, K Latva-Kala, P Koski. Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria. *Microbiology*. 1997. Oct. P.143.
92. Ben Belgacem Z., Bijttebier S., Verreth C., Voorspoels S., Van de Voorde I., Aerts G. Biosurfactant production by *Pseudomonas* strains isolated from floral nectar. *J Appl Microbiol*. 2015. Vol. 118(6). P. 1370-1384.
93. A Sotirova, D Spasova, E Vasileva-Tonkova, D Galabova. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*. 2007. Vol. 6. P.23-28.
94. Gang Chen, Honglong Zhu. Lux-marked *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide production in the presence of rhamnolipid. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005. Vol. 10. 41 (1). P.43-48.
95. E. Vasileva-Tonkova, D. Galabova, E. Karpenko, A. Shulga. Biosurfactant-rhamnolipid effects on yeast cells. *Lett Appl Microbiol*. 2001. 33 (4). P.280-284.
96. D. Spasova. D. Galabova .Yeast permeabilization as a tool for measurement of in situ enzyme activity: localization of alkaline phosphatase. *Z Naturforsch*. Vol. 53. (5-6). P.347-351.
97. H. Chong, Q. Li. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*. 2017. Vol. 16. P. 137.

98. Hua Zhong, Guang Zeng, Xing Yuan. Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. Vol. 27. P.785-789.
99. Hua Zhong, Guang Zeng, Jian Liu. Adsorption of monorhamnolipid and dirhamnolipid on two *Pseudomonas aeruginosa* strains and the effect on cell surface hydrophobicity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008. Vol. 29. P.26-29.
100. A. Ortiz, J. Teruel, Á. Manresa. Effects of a bacterial trehalose lipid on phosphatidylglycerol membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011. Vol. 1808. P. 2067–2072.
101. US Patent #5.767.090. Microbially produced Rhamnolipids for the control of plant pathogenig zoosporic fungi. Pub. 16 june 1998.
102. T. Nielsen, J. Sorensen. Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *J Bacteriol.* 1983. Vol. 168(2). P .528–531.
103. S. Lang, B. Frautz, G. Henke. Production and biological activity of biosurfactants. 17 th FEBS Meeting Berlin. 1986, August 24-29. P. 212-214.
104. M. Remichkova, D. Galabova, I. Roeva. Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. *Biotechnol Bioeng.* 2000. Vol. 5-63 (1). P.21-29.
105. F. Ferris, T. Beveridge, M. Marceau-Day, A. Larson. Structure and cell envelope associations of flagellar basal complexes of *Vibrio cholerae* and *Campylobacter fetus*. *Can J Microbiol.* 1984. Vol. 30 (3). P.322-333.
106. M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, A. Manresa. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2004. Vol. 85 (1). P.1-8
107. D. Sachdev, S. Cameotra. Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2013. Vol. 97. P. 1005–1016.
108. Mulqueen P. Recent advances in agrochemical formulations. *Adv Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 106. P. 83–107.

109. Shekhar S, Sundaramanickam A, Balasubramanian T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2015. Vol. 45(14). P. 1522-1554.
110. P. Brocklehurst, J. Dearman. A comparison of different chemicals for osmotic treatment of vegetable seed. *Annals of Applied Biology*. 1984. Vol. 105. P. 391 – 398.
111. Humpherson-Jones F. M. Effect of surfactants and fungicides on clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of brassicas. *Annals of Applied Biology*. 1993. Vol. 122. P. 457 – 465.
112. Blackwell PS. Management of water repellency in Australia and risks associated with preferential flow, pesticide concentration and leaching. *J Hydrology*. 2000. Vol. 231–232. P. 384–395.
113. Street JC. Methods of removal of pesticides residues. *Canad Med Ass J*. 1969. Vol. 100. P. 154–160.
114. Petrovic M, Barcelo D. Analysis and fate of surfactants in sludge and sludge-amended soil. *Trends Analyt Chem*. 2004. Vol. 23. P. 10–11.
115. Scott MJ, Jones MN. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim Biophys Acta*. 2000. Vol. 1508. P. 235–251.
116. Takenaka S., Tonoki T., Taira K., Murakami S., Aoki K. Adaptation of *Pseudomonas* sp. strain 7–6 to quaternary ammonium compounds and their degradation via dual pathways. *Appl Environ Micro*. 2007. Vol. 73. P. 1797–1802.
117. Lima TM, Procópio LC, Brandão FD, Leão BA, Tótola MR, Borges AC. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. *Bioresour Technol*. 2011. Vol. 102. P. 2957–2964.
118. Debode J, De Maeyer K, Perneel M, Pannecouque J, De Backer G, Höfte M. Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium microsclerotia* by *Pseudomonas* spp. *J Appl Microbiol*. 2007. Vol. 103. P. 1184–1196.
119. Andersen J., Koch B., Nielsen T., Sørensen D., Hansen M., Nybroe O., Christophersen C., Sørensen J., Molin S., Givskov M. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiol*. 2003. Vol. 149. P. 37–46.

120. Maaike Perneel, Liesbet D'hondt, Katrien De Maeyer. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environ Microbiol.* 2008. Vol. 10 (3). P. 778-788.
121. Kim P., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R., Chi Y. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J Appl Microbiol.* 2004. Vol. 97. P. 942–949.
122. Nihorimbere V., Marc Ongena M., Smargiassi M., Thonart P. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2011. Vol. 15. P. 327–337.
123. Migahed M., Abd El Raouf M., Al Sabagh M., Abd El Bary H. Effectiveness of some non ionic surfactants as corrosion inhibitors for carbon steel pipelines in oil fields. *Electrochim. Acta.* 2005. Vol. 50. P.4683-4689.
124. Chebabe, D., Chikh, Z. A., Dermaj, A., Rhattas, K., Jazouli, T., Hajjajji, N., El Mdari, F., and Srhiri, A. Synthesis of bolaamphiphile surfactants and their inhibitive effect on carbon steel corrosion in hydrochloric acid medium. *Corros. Sci.* 2004. Vol. 46. P. 2701-2713.
125. C. Dagbert, T. Meylheuc, M.-N. Bellon-Fontaine. Corrosion behaviour of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *P. fluorescens*. *Electrochimica Acta.* 2006. Vol. 51. P. 5221 – 5227.
126. Sim L. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *P. aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microb. Biotechnol.* 1997. Vol.19. P.232-238.
127. Sylatk C. Biosurfactants. *Biotechnol. Forum.* 1984. Vol.1. P.58-66.
128. Abdel-Mawgoud Ahmad, Mohammad Aboulwafa, Nadia Hassouna. Characterization of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. *Appl Biochem Biotechnol.* 2008. Vol. 27. P.421-426.
129. Guo-liang Zhang, Yue-ting Wu, Xin-ping Qian, Qin Meng. Biodegradation of crude oil by *P. aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005. Vol. 6 (8). P.725-730.
130. M. LaMontagne, A. Bruce, P A Holden. Assessing the role of *P.aeruginosa* surface-active gene expression in hexadecane biodegradation in sand. *Appl Environ Microbiol.* 2002. Vol. 68 (5). P. 2509-2518.

131. Zhang Y., Miller R. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol.* 1992. Vol. 58. P. 3276-3282.
132. Zhang Y. Miller R. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl Environ Microbiol.* 1994. Vol. 60 (6). P.2101-2106.
133. R. Al-Tahhan, T. Sandrin, A. Bodour, R. Maier. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *P. aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol.* 2000. Vol. 6 (8). P.3262-3268.
134. Yan-jun Chen, Hong-qi Wang, Ran Wang. Effects of rhamnolipid on the biodegradation of *n*-hexadecane by microorganism and the cell surface hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol.* 2007. Vol. 28 (9). P.2117-2122.
135. W. Noordman, D. Janssen, Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2002. Vol. 68 (9). P.4502-4508.
136. R. Beal, W B Betts. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2000. Vol. 89 (1). P.158-168.
137. Haiyan Fu, Guangming Zeng, Hua Zhong. Effects of rhamnolipid on degradation of granular organic substrate from kitchen waste by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *J Appl Microbiol.* 2000. Vol.86 (2). P.123-128.
138. K. Rahman, I M Banat, J Thahira. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresour Technol.* 2002. Vol.81 (1). P.25-32.
139. Zhang Y., Miller R. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. *Appl Environ Microbiol.* 1995. Vol.61 (6). P.2247- 2254.
140. A. Perfumo, I. Banat, F. Canganella, R. Marchant. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005. Vol. 13. P.1-7.

141. Y. Li, X. Zheng, B. Li. Influence of biosurfactant on the diesel oil remediation in soil-water system. *J Environ Sci (China)*.2006. Vol.18 (3). P. 587-590.
142. B. McKew, F. Coulon, M. Yakimov. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1996. Vol.62 (6). P.2134-49.
143. A. Perfumo, I. Banat, R. Marchant, L. Vezzulli. Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Chemosphere*. 2006. Vol. 16. P.3211-3215.
144. K. Rahman, T. Rahman, Y. Kourkoutas, I. Petsas, R. Marchant, I. Banat. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol*. 2003. Vol. 90 (2). P.159-168.
145. L. Whang, P. G Liu, C. Ma, S. Cheng. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J Hazard Mater*. 2007. Vol. 26. P.246-249.
146. A Abalos, M Viñas, J Sabaté. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation*. 2004. Vol.15 (4). P. 249-260.
147. K. Urum, S. Grigson, T. Pekdemir, S. McMenamy. A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere*. 2005. Vol. 7. P.356-359.
148. S. Arino, R. Marchal, J. Vandecasteele. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J Appl Microbiol*. 1998. Vol. 84 (5). P.769-776.
149. K. Urum, T. Pekdemir. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*. 2004. Vol. 57 (9). P.1139-1150.
150. S. Berselli, G. Milone, P. Canepa. Effects of cyclodextrins, humic substances, and rhamnolipids on the washing of a historically contaminated soil and on the aerobic bioremediation of the resulting effluents. *Biotechnol Bioeng*. 2004. Vol. 88 (1). P.111-120.



151. K. Urum, T. Pekdemir, M. Copur. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. *Chemosphere*. 2003. Vol.54 (9). P.1013-1028.
152. L. Zhu, M. Zhang. Effect of rhamnolipids on the uptake of PAHs by ryegrass. *Environ Pollut*. 2008. Vol. 15. P.258-262.
153. F. Ledgham, C. Soscia, A. Chakrabarty. Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR<sub>2</sub> (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing. *Res Microbiol*. 2003. Vol. 154 (3). P.207-213.
154. K. Shin, K. Kim. A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenanthrene and diesel in sand. *Environ Geochem Health*. 2004. Vol.26 (1). P.5-11.
155. K. Shin, K. Kim, E. Seagren. Combined effects of pH and biosurfactant addition on solubilization and biodegradation of phenanthrene. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004. Vol. 65 (3). P.336-343.
156. S. Dean, Y. Jin, D. Cha. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J Environ Qual*. Vol. 30 (4). P.1126-1133.
157. K. Shin, Y. Ahn, K. Kim. Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene. *Environ Toxicol Chem*. 2005. Vol. 24 (11). P. 2768-74
158. M. Van Dyke, P. Couture, M. Brauer. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can J Microbiol*. 1993. Vol. 39 (11). P. 1071-18.
159. J. Clifford, M. Ioannidis, R. Legge. Enhanced aqueous solubilization of tetrachloroethylene by a rhamnolipid biosurfactant. *J Colloid Interface Sci*. 2006. Vol. 19. P. 253-58.
160. François Bordas, Pierre Lafrance, Richard Villemur. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. *Environ Pollut*. 2005. Vol.138. P.69-76.
161. Nakata K. Two glycolipids increase in the bioremediation of halogenated aromatic compounds. *J Biosci Bioeng*. 2000. Vol.89 (6). P.577-81.

162. Y. Cho, E. Ostrofsky, G. Rhee. Effects of a rhamnolipid biosurfactant on the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by St. Lawrence River (North America) microorganisms. *Environ Toxicol Chem.* 2004. Vol. 23. P.1425-30.

161. M. Alam, N. Roy, D. Mandal, N. Begum. Green chemistry for nanochemistry: exploring medicinal plants for the biogenic synthesis of metal NPs with fine-tuned properties. *Rsc Advances.* 2013. Vol. 3(30). P. 11935-11956.

162. Y. Shiraishi, N. Toshima. Oxidation of ethylene catalyzed by colloidal dispersions of poly(sodium acrylate)-protected silver nanoclusters. *Colloids Surf A.* 2000. Vol. 169. P. 59-66.

163. M. Bloemer, J. Haus, P. Ashley. Degenerate four-wave mixing in colloidal gold as a function of particle size. *J Opt Soc Am B.* 1990. Vol.7. P. 790-795.

164. L. Chang, C. Yen. Studies on the preparation and properties of conductive polymers. VIII. Use of heat treatment to prepare metallized films from silver chelate of PVA and PAN. *Appl Polym Sci.* 1995. Vol. 55. P. 371-374.

165. P. Matejka, B. Vlckova, J. Vohidal, P. Pancoska, V. Baumrunk. The role of triton X-100 as an adsorbate and a molecular spacer on the surface of silver colloid: A surface-enhanced Raman scattering study. *J Phys Chem.* 1992. Vol.96. P. 1361-66.

166. X. Li, J. Zhang, W. Xu, H. Jia, X. Wang, B. Yang. Mercaptoacetic acid-capped silver nanoparticles colloid: Formation, morphology, and SERS activity. *Langmuir.* 2003. Vol.19. P. 4285-4290.

167. Q. Limin, G. Yueying, M. Jiming. Synthesis of ribbons of silver nanoparticles in lamellar liquid crystals. *Colloids Surf A.* 1999. Vol. 157. P. 285-294.

168. L. Jiang, A. Wang, Y. Zhao, J. Zhang, J. Zhu. A novel route for the preparation of monodisperse silver nanoparticles via a pulsed sonoelectrochemical technique. *Inorg Chem Commun.* 2004. Vol.7. P. 506-509.

169. J. Lin, W. Zhou, C. O'Connor. Formation of ordered arrays of gold nanoparticles from CTAB reverse micelles. *Mater Lett.* 2001. Vol. 49. P. 282-286.

170. I. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M. Martinotti, L. Fracchia. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010. Vol.87. P. 427-444.

171. C. Mulligan, S. Sharma, A. Mudhoo. Biosurfactant-mediated nanoparticle synthesis a green and sustainable approach. In book: Biosurfactants: Research Trends and Applications Publisher: CRC Press. 2014.
172. G. Płaza, J. Chojniak-Gronek, I. Banat. Biosurfactant mediated biosynthesis of selected metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014. Vol. 15(8). P 13720-13737.
173. C. Farias, A. Silva, R. Rufino, J. Luna, J. Souza, L. Sarubbo. Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2014. Vol. 17. Issue 3. P. 122-125.
174. Ф. Герхардт. Методы общей бактериологии. М.: Мир. 1983. 535 с.
175. A. Sotirova, T. Avramova, S. Stoitsova, I. Lazarkevich, V. Lubenets, E. Karpenko, D. Galabova. The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates. *Current Microbiology*. 2012. Vol. 65. P. 534-541.
176. Patent US5656747A. Process for the quantitative purification of glycolipids. J. Mixich, R. Rothert, D. Wullbrandt. 1997.
177. S. Ando, M. Saito. Chromatography lipid, biomedical research and chemical diagnostic. Elsevier.: Amsterdames. 1987. P. 266-310.
178. Dong Z., Sun X. A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*. *Chin. Sci.Bull.* 2000. Vol. 45. Issue 3. P. 252–256.
179. Виноградова Р.П., Храпунов С.Н. Физико-химические методы в биохимии. К.: Вища школа. 1983. 287 с.
180. Кореман И.М. Методы определения органических соединений. М.: Химия. 1970. 343 с.
181. F. Bordas, P. Lafrance, R. Villemurordas. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. *Environ Pollut.* 2005. Vol. 138. P.69-76.
182. Штивель Н.Х., Типикова Л.И., Смирнова З.С. Определение нефтепродуктов в водах методом ИК– спектроскопии. *Химия и технология воды*. 1985. Т. 7. №2. С. 47–49.
183. К. Миттел. Мицеллообразование, соллюбилизация и микроэмульсии. М.:Мир. 1980. 597 с.

184. Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Файнгольд С.И. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение. Л.:Химия. 1988. 200с.
185. L. Guerra-Santos, O. Kappeli, A. Fiechter. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactants production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. envirl Microblol.* 1984. Vol. 48. P. 301-305.
186. Р.В. Кучер, О. Ю Лесик, О.В. Карпенко. Емульгування вуглеводнів – нова властивість культури дріжджів *Phaffia rhodozyma*. *Доп. АН УРСР. Сер.Б. Геол., хім. та біол. науки.* 1990. № 8. С.49-53.
187. ДСТУ 3789-98. Піноутворювачі загального призначення. Київ.: Держспоживстандарт України, 2000. 25 с.
188. Th. Tadros, B. Vinsent. Emulsion Stability. Encyclopedia of Emulsion Technology. Inc. New York. 1983. Vol.1. 219 p.
189. K. Medrzycka, E. Hallmann, S.Pastewski, E.Karpenko. Adsorption properties of triton X-100 and rhamnolipid biosurfactant in the cotex of soil remediation. Proc. of 4-th International Conference “*Oils and environment*”. POMCERT- Gdansk, Poland. 2005, p. 138-143.
190. А. Шатенштейн, Ю. Правикова, П. Алиханов, К. Данова, А. Изюмников. Практическое руководство по определению молекулярных весов и молекулярно-весового распределения полимеров. М.: Химия, 1964. 150 с.
191. В.В. Бирюков, В.М. Кентере. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. М.:Наука, 1985. 215 с.
192. Коппель И.А., Паю А.И. Реакционная способность органических соединений. *ЖОХ.* 1974. т.11. №1. с.121-138.
193. I.A. Koppel, V.A. Palm. In Advances in linear free energy. Relationships. Eds. Plenum Press. London-New York, 1973. P. 203-280.
194. Reichardt Ch. Solvent and Solvent Effects in Organic Chemistry. 3-th ed. Wiley VCH Verl. Weinheim, 2003. P.630.
195. E. Vasileva-Tonkova, V. Gesheva. Glycolipids produced by *Nocardioides sp.* During growth on n-paraffin. *Process Biochemistry.* 2005. Vol. 40. P. 2387-2391.
196. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248-254.

197. Методичні вказівки по контролю токсичності промислових стічних вод на різних етапах технологічного процесу, рекомендаційний документ Охорони навколишнього природного середовища та раціональне використання природних ресурсів. Київ, 1996. 24 с.

198. ДСТУ 4138-2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. 29 с.

199. Доспехов Б. Методика полевого опыта. М.:Агропромиздат, 1985. 351 с.

200. Wilson K. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. *Soil. Biol. Biochem.* 1995. Vol. 27. P. 501-514.

201. З. Слободян, Я. Хабурський, Ю. Горак. Екстракти дубової кори – “зелені” інгібітори корозії середньовуглецевих сталей у нейтральних та кислих середовищах. *Вісник ТНТУ*. 2012. Том 68, с.23-29.

202. Pokhmurs'kyi V.I., Karpenko O.V., Zin I.M., Tymus' M.B., Veselivs'ka H.H. Inhibiting action of biogenic surfactants in corrosive media. *Materials Science*. 2014. Vol. 50. Iss. 3. P. 448—453.

203. Лакин А.Н. Курс вариационной статистики. К.:Вища школа, 1990. 116 с.

204. M. Abouseouda, R. Maachi, A. Amranec. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 2008. Vol. 223. P. 143 – 151.

205. G. Pekin, F. Vardar-Sukan, N. Kosaric. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using turkish corn oil and honey. *Engineering in Life Sciences*. 2005. Vol. 5. P. 357 – 362.

206. P. Rahman, T. Rahman, S. McClean. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials *Biotechnology Progress*. 2002. Vol. 18. P. 1277 – 1281.

207. S. George, K. Jayachandran. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology*. 2013. Vol. 114. P. 373 – 383.

208. Дебабов В.Г. Биотопливо. *Биотехнология*. 2008. № 1. С. 3-14.

209. Т.П. Пирог, М.О.Шуляков, Т.А.Шевчук. Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах. *Biotechnologia acta*. V.6. №6. 2013. С. 28-44.

210. J. Van Hamme, A. Singh, O. Ward. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2006. Vol. 24. P. 604 – 620.

211. Recommendations for reporting the results of correlation analysis in chemistry using regression analysis. *Quant. Struc. Acta Relat*. 1985. V. 4. №. 1. 29 P.

212. N. Gunther, A. Nuñez, W. Fett, D. Solaiman. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Appl Environ Microbiol*. 2005. Vol. 71(5). P. 2288–2293.

213. Solaiman D., Ashby R., Gunther N., Zerkowski J. Dirhamnose-lipid production by recombinant nonpathogenic bacterium *Pseudomonas chlororaphis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015. Vol. 99(10). P.4333-42.

214. Пристай М. В. Біотехнологія поверхнево-активних речовин бактерій родів *Gordonia* і *Rhodococcus* : дис. ... канд. техн. наук. : 03.00.20 – біотехнологія. Львів, 2012. 150 с.

215. Єрохін В.А. Біотехнологія поверхнево-активних рамноліпідів штаму *Pseudomonas* sp. PS–17 у ферментері: дис. ... канд. техн. наук. : 03.00.20 – біотехнологія. Львів, 2015. 170 с.

216. О. В. Карпенко, В. А. Єрохін, М. В. Пристай, О. М. Шульга. Застосування вихрового ферментера для одержання продуктів мікробного синтезу. *Вопросы химии и химической технологии*. 2012. № 2. С. 34-39.

217. Карпенко І. В. Біотехнологія рамноліпідних поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та їх застосування для олійних рослин: дис. ... канд. техн. наук : 03.00.20 – біотехнологія. Львів, 2017. 141 с.

218. Сидоров Ю., Влязло Р., Новіков В. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. *Навчальний посібник*. Львів: “Інтелект-Захід”, 2008. 736 с.

219. D. Adams, W.-S. Hu. Application of stoichiometric and kinetic analyses to characterize cell growth and product formation. *Animal cell biotechnology: Methods and protocols*, Second edition. NJ.: Humana Press. Totowa, 2007. P. 235.

220. В. А. Єрохін, Т. Я. Покинсьброда, О. В. Карпенко. Поверхнево-активні препарати на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. *Наукові праці Донецького національного технічного університету*. 2008. №134 (10). С. 111-117.

221. О.В. Посилкіна, Р.В. Сагайдак. Економіка, планування та організація хіміко-фармацевтичного виробництва: *Навч. посіб. для студ. вищ навч. закладів*. Х.: Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2004. 160 с.

222. R. Kanna, S. Gummadi, G. Kumar. Production and characterization of biosurfactant by *Pseudomonas putida* MTCC 2467. *Journal of Biological Sciences*. 2014. Vol. 14. P. 436-445.

223. Киця, А. Р., Решетняк, О. В., Базиляк, Л. І., Гринда, Ю. М. Спектри екстинкції водних золів наночастинок срібла як характеристика їх розміру та полідисперсності. *Журнал нано- та електронної фізики*. 2013. Т. 5. № 4(2). С. 04064 - 04065.

224. Brinkmann D., Rohhrs J., Suglerl K. Bioremediation of diesel fuel contaminated soil in a rotating bioreactor. *Chem.Eng.Technol.* 1998, V.21. P.168-172.

225. Goclik E., Muller-Hurtig R., Wagner F. Influence of the glicolipid-producing bacterium *Rhodococcus erythropolis* on the degradation of a hydrocarbon mixture by an original soil population. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 1990. V.34. P. 122-126.

226. Демиденко А.Я., Демурджан В.М. Пути восстановления плодородия нефтезагрязненных почв черноземной зоны Украины. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.:Наука, 1988. С.197-206.

## ДОДАТОК А. СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Покин'брода Т. Я., Хом'як С. В., Швед О. В., Парашин Ж. Д., Комаровська-Порохнявець О. З., Карпенко О. В., Вільданова-Марцишин Р. І., Федоришин Ю. І., Наконечний М. В., Новіков В. П. Очистка ґрунтів від нафтових забруднень біотехнологічними шляхами. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2002. № 461. С. 208-211.

2. Єрохін В. А., Покин'брода Т. Я., Карпенко О. В., Новіков В. П. Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом *Pseudomonas species* PS-17 – продуцента позаклітинних біосурфактантів. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2006. № 553. С. 124-127.

3. Щеглова Н.С., Карпенко О. В., Покин'брода Т.Я. Лубенець В.І., Швед О.В.. Гліколіпідні ПАР – екологічно безпечні стимулятори росту сільськогосподарських рослин. *Вісник НУ «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2007 №590. С.133-138 .

4. Малаховська-Ютш А., Покин'брода Т., Карпенко Е. Деградація бензпирена почвенними мікроорганізмами в присутствіи гліколипидов, синтезованих штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17. *Биотехнология*. 2007. № 3. С. 68 – 73 (Російська Федерація).

5. Єрохін В. А., Покин'брода Т. Я., Карпенко О. В. Поверхнево-активні препарати на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. *Наукові праці Донецького національного технічного університету*. Серія: *Хімія і хімічна технологія*. 2008. №134 (10). С. 111-117.

6. Єрохін В. А., Карпенко О. В., Покин'брода Т. Я, Лубенець В. І.. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов мікробного синтезу поверхнево-активних речовин. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2008. № 609. С. 135-140.



7. Підбір оптимальних екстрагентів біологічно активних сполук на основі принципу лінійності вільних енергій. Т. Я. Покинсьброд, О. В. Карпенко, Р. Г. Макітра, О. Я. Пальчикова, Н. В. Роговик, В. І. Роговик. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2008. № 622. С. 103-106.

8. Покинсьброд Т.Я., Пирог Т.П., Карпенко О.В., Пристай М.В., Болібрух Л. Д. Синтез поверхнево-активних речовин штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на змішаних субстратах. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2016. № 841. С. 210-217.

9. Kłosowska-Chomiczewska I.E., Mędrzycka K., Hallmann E., Karpenko E., Pokynbroda T., Macierzanka A., Jungnickel C. Rhamnolipid CMC prediction. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017. Vol. 488. P. 10-19.

10. Покинсьброд Т.Я., Карпенко О.В., Зінь І.М. Нові поверхнево-активні речовини штаму *Pseudomonas aureofaciens* NB-1. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 3(113). С. 71-76.

11. Карпенко О.В., Волошинець В.А., Карпенко І.В., Семенюк І.В., Мідяна Г.Г., Покинсьброд Т.Я. Колоїдні характеристики водних систем рамноліпідного біокомплексу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 з TWEEN-80 та їх перспективи для біотехнології. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2017. № 6. С. 7-13.

12. Покинсьброд Т.Я., Карпенко О.В., Лубенець В. І., Мартинюк Н.Б., Зінь І.М. Біосинтез ПАР мікроорганізмами родів *Pseudomonas* на соєвій олії та дослідження їх властивостей. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2017. № 868. С. 222-229.

13. Патент України на корисну модель № 71792 А. Поверхнево-активний біопрепарат. Карпенко О.В., Мартинюк Н.Б., Шульга О.М., Покинсьброд Т.Я., Вільданова-Марцишин Р.І., Щеглова Н.С. 24.01.2004, Бюл.12.

14. Патент України на корисну модель №36704. Біопрепарат для бобових і злакових рослин. Лісова Н.Ю., Карпенко О. В., Щеглова Н.С., Вільданова-Марцишин Р.І., Покинсьброд Т.Я., Козуб Ю.Б., Галан М.С., Наконечний М.В. 10.11.2008, Бюл. №21.

15. Karpenko E., Kolwzan B., Vildanova-Martysyshyn R., Scheglova N., Pokynbroda T., Grabas K. Method of remediation of soils from petroleum-products - enhanced cleaning by biosurfactants. *International Conf. on Bioremediation of Soil and Groundwater*, 5-8 September 2004. Sci. Mater. Cracow (Poland). 2004. P. 93.

16. Карпенко О., Вільданова-Марцишин Р., Щеглова Н., Покинсьброда Т., Шеремета Ю., Мартинюк Н., Брик Ж., Туровський А., Солтис М. Утилізація відходів нафтовидобувної промисловості – актуальна проблема Західного регіону. *Тези доп. 2 міжнар. конф. «Чистота довкілля в нашому місті»*. 2004. Трускавець. С.150-151.

17. Карпенко О.В., Колвзан Б., Грабас К., Щеглова Н.С., Покинсьброда Т.Я., Вільданова-Марцишин Р.І., Макітра Р.Г., Мартинюк Н.Б., Шеремета Ю.Б. Нові препарати для знешкодження відходів нафтовидобувної промисловості. *Тези доп. 2-ої Всеукр. наук.-практ. конф. «Біотехнологія. Освіта. Наука»*. Збірник наук. праць. Львів. 2004. С. 150-151.

18. Покинсьброда Т., Єрохін В., Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Лубенець В., Новіков В., Солтис М. Методи отримання поверхнево-активних ліпідів для нових фармпрепаратів. *Тези доп. 2-ої Всеукраїнської наук.-практ. конф. «Біотехнологія. Освіта. Наука»*. Збірник наук. праць. Львів. 2004. С.83.

19. Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Лісова Н., Покинсьброда Т., Туровський А. Регуляція синтезу полісахаридів азотфіксуючих бактерій. *Зб. наук. праць за матеріалами 10-ї наук. конф. «Львівські хімічні читання-2005»*, (Львів, 25-27 травня 2005 р.). М-во освіти і науки України, Львів, нац. універ. ім.Франка. Львів, видавнич. центр Львів. нац. універ. ім.Франка, 2005. С. Д8.

20. Карпенко О., Щеглова Н., Вільданова-Марцишин Р., Шульга О., Покинсьброда Т., Туровський А. Екологічна роль поверхнево-активних речовин мікробного походження. *Зб. наук. праць 10-ї наук. конф. «Львівські хімічні читання-2005»*. Львів, 25-27 травня 2005 р. М-во освіти і науки України, Львів. нац. універ. ім.Франка. Львів, видавнич. центр Львів. нац. універ. ім. Франка, 2005. С.

21. Karpenko E., Hafiychuk H., Pokynbroda T., Yerokhin V. Mathematical modeling and optimization of methabolic process in biotechnology. *Annual Conference in Ukraine. Statistical Physics 2005: Modern Problems and New Applications*. Book of abstracts. 28-30 August 2005. Lviv. P. 140.

22. Karpenko E., Kolwzan B., Pokynbroda T., Martynyuk N., Lubenets V., Grabas K., Novikov V., Gvozdjak P., Fedoryshyn Y. Biologiczne metody oczyszczania srodowiska z zanieczyszczen naftowych stosowane na Ukrainie. *Zanieczyszczenie srodowiska produktami naftowymi I innymi antropogennymi zanieczyszczeniami organicznymi, ich analityka, monitoring i usuwanie*. Ustronie Morskie, May 18-21.05.2005. C.41-48.

23. Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов для мікробного синтезу поверхнево активних речовин. *II Міжнародна конференція “Молодь та поступ біології”*. Зб. тез доп. Львів, ЛНУ ім. І.Франка. 2006 р. С.291.

24. Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Новіков В.П. Розробка методу виділення біоПАР з культуральної рідини *Pseudomonas species PS-17*. *III Всеук. Наук.-практ. конференція „Біотехнологія. Освіта. Наука”*. Зб. тез доп. Харків: НУ „ХПІ”. 2006 р. с.111.

25. Pashynska V., Glamazda A., Plohotnichenko A., Karpenko E., Pokynbroda T., Karachevtsev V. Spectroscopic investigations of carbon nanotubes in aqueous suspensions with biosurfactants. *XXIX th European Congress on Molecular Spectroscopy EUCMOS 2008*. August 31-September 5. 2008. Opatija, Croatia. Book of Abstracts. P.171.

26. Пристай М.В., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Макітра Р.Г. Оцінка екстракційної здатності розчинників при виділенні біологічних поверхнево-активних речовин. *Тези доп IV міжнародної науково-практичної конференції „Біотехнологія. Наука Освіта. практика”*. 11-13 листопада 2008 р. Дніпропетровськ: УДХТУ. 2008. С.51-52.

27. Макітра Р.Г., Карпенко О.В., Покинсьброда Т.Я., Роговик В.І., Пальчикова О.Я., Роговик Н.В. Прогнозування розподілу біологічно активних речовин між органічною та водною фазами. *Тези доп. нац. наук.-практ. конференції з міжнар. участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових*

біологічно активних сполук та фарм. препаратів», Львів, 15-18 жовтня. 2008. Вид. «Львівська політехніка». С.161.

28.Покиньброда Т., Пристай М., Єрохін В., Карпенко О. Зміна проникності клітинних мембран під впливом біогенних поверхнево-активних речовин. *V міжнар. конф. "Молодь та поступ біології"*. Зб. тез доп. Львів, ЛНУ ім. І.Франка. 2009 р. Т.2. С.197.

29.Карпенко І.В., Покиньброда Т.Я., Карпенко О.В., Баранов В.І. Стимулювання росту рослин мікроорганізмами роду *Pseudomonas*. *Матеріали наук. конференції "Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного парку"*. Шацьк. 10–13 вересня 2015 р. С.37-38.

30.Pokynbroda T.Y., I.V. Karpenko, V.P. Novikov, V.I. Baranov, O.V. Karpenko. The biosynthesis products of the bacteria of genus *Pseudomonas* for plant cultivation. *International Scientific Congress «Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology»*. 29 September – 2 October 2015. Lviv. Ukraine. P. 80.

31.Покиньброда Т.Я., Карпенко О.В. Синтез біосурфактантів штамми *Pseudomonas* на відходах виробництва біодизелю. *Матеріали міжнар. наук.-практ. інтернет-конф. «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації»*. 14-15 грудня 2016 р. С.155-160.

32. Зінь Я.І., Хлопик О.П., Покиньброда Т.Я. Вплив розмірів катодних включень на корозію модельних зразків алюмінієвого сплаву. *Матеріали відкритої науково-технічної конференції молодих науковців і спеціалістів ФМІ ім. Г.В. Карпенка НАН України КМН-2017*. Львів-2017. С. 70-75.

33. Зінь І.М., Тимусь М.Б., Хлопик О.П., Покиньброда Т.Я. Інгібування корозії дюралюмінієвого сплаву (Д16Т) рамноліпідним біокомплексом (РБК) та супернатантом культуральної рідини (СКР) у корозивних середовищах. *Матеріали XIII міжнар. наук.-тех. конференції "ABIA-2017"*. 19-21 квітня. Київ 2017. С. 27.99.

34.Наконечна А.В., Баня А.Р., Карпенко А.Я., Хомяк С.В., Покиньброда Т.Я., Швець В.В., Новиков В.П., Лубенець В.И. Использование тиосульфатов в комплексной фиторемедиации загрязненной нефтью почвы. *Материалы XIII междунар. науч.-практ. конф. «Технологические аспекты современного*

аграрного производства и охраны окружающей среды». 8-11 ноября 2017. Алматы, Казахстан. С. 47-48.

35. Семенюк И.В., Баня А.Р., Покинъброда Т.Я., Мидяна Г.Г., Карпенко Е.В. Влияние гуминовых композиций на ростовые показатели пшеницы озимой. *Материалы XIII междунар. науч.-практ. конф. «Технологические аспекты современного аграрного производства и охраны окружающей среды»*. 8-11 ноября 2017, Алматы, Казахстан. С. 73-75.

36. Karpenko E., Lisova N., Scheglova N., Vildanova R., Pokynbroda T., Hamkalo Z. The perspectives of using ecologically safe surfactants for agriculture. *In: Development in production and use of new agrochemicals. Chemistry for Agriculture*. Edited by H.Gorecki, Zb. Dobrzanski, P. Kafarski. Chem-Pol Trade. 2005. Vol.6. P. 786–793.

37. Карпенко Е. В., Покинъброда Т.Я., Макитра Р.Г., Пальчикова Е.Я. Оптимальные методы выделения биогенных поверхностно-активных рамнолипидов. *Журнал общей химии*. 2009. Т. 12. С. 2011-2014.

38. Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Ващенко Л. М., Покинъброда Т. Я., Карпенко О. В. Синтез сурфактантів штамами *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Мікробіологічний журнал*. 2009. Т. 71. №3. С. 10 – 14.

**ДОДАТОК Б. АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ**



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної

роботи

Національного університету

«Львівська політехніка»

проф. Давидчак О.Р.

2018 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

### 1. Назва пропозиції для впровадження:

«Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування»

### 2. Установа, її адреса, виконавець:

Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М.Литвиненка НАН України, м. Львів, вул. Наукова За здобувач наукового ступеня к.т.н. Покиньброда Т.Я.

### 3. Джерела інформації:

1. Kłosowska-Chomiczewska I.E., Mędrzycka K., Hallmann E., Karpenko E., Pokynbroda T., Macierzanka A., Jungnickel C. Rhamnolipid CMC prediction // Journal of Colloid and Interface Science. V. 488. 2017. P. 10-19.

2. Karpenko E., Kolwzan B., Pokynbroda T., Martynyuk N., Lubenets V., Grabas K., Novikov V., Gvozdjak P., Fedoryshyn Y. Biologiczne metody oczyszczania srodowiska z zanieczyszczen naftowych stosowane na Ukrainie // Zanieczyszczenie srodowiska produktami naftowymi I innymi antropogennymi zanieczyszczeniami organicznymi, ich analityka, monitoring i usuwanie. Ustronie Morskie, May 18-21.05.2005. С.41-48.

4. Покиньброда Т.Я., Карпенко О.В., Лубенець В. І., Мартинюк Н.Б., Зінь І.М. Біосинтез ПАР мікроорганізмами родів *Pseudomonas* на соєвій олії та дослідження їх властивостей // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2017. № 868. С. 222-229.

1. Впроваджено: у науково-дослідну роботу і навчальний процес кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ «Львівська політехніка».

2. Термін впровадження: вересень 2018р.

3. Ефективність впровадження: апробація та використання роботи свідчать, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелі інформації. Розроблену біотехнологію синтезу поверхнево-активних продуктів штамом *P. fluorescens* 8573 апробовано у пілотному реакторі об'ємом 100 л. Продуктом є супернатант культуральної рідини, що має наступні показники: поверхневий натяг – 29,0 мН/м, вміст біокомплексу – 12,0 г/дм<sup>3</sup>, індекс емульгування – 65 %.

Результати дисертаційної роботи використовуються в науковій роботі магістрів та навчальному процесі кафедри, зокрема у викладанні спецкурсів «Основи біотехнологічного виробництва» та «Загальна біотехнологія».

4. Зауваження та пропозиції: немає.

### Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри  
технології біологічно активних сполук,  
фармації та біотехнології,  
д.х.н., проф.

В.П. Новіков

„Затверджую”

Директор Фізико-механічного інституту  
ім. Г.В.Карпенка НАН України  
академік НАН України  
З. Т. Назарчук

”\_\_\_\_\_” 2018р.

### А К Т

використання результатів дисертаційної роботи

„Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування”  
*Покинсьброди Тетяни Ярославівни*

Одержані результати наукових досліджень в області застосування поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, що наведені в дисертаційній роботі *Покинсьброди Тетяни Ярославівни* «Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування», використовуються в науково-дослідних роботах відділу фізико-хімічних методів протикорозійного захисту металів для створення інгібувальних композицій на основі біогенних поверхнево-активних речовин. Отримані результати спрямовані на проведення подальших досліджень з метою розширення області використання одержаних сполук.

Завідувач відділу фізико-хімічних методів  
протикорозійного захисту металів  
Фізико-механічного інституту  
ім. Г.В.Карпенка НАН України,  
доктор тех. наук, ст.н.с.

І.М. Зін





Україна, 24321, м.Ладизин, вул.Хлібозаводська 2  
 р/р 26002704182511 в ПАТ «Райффайзен банк АВАЛЬ» м. Київ, МФО 380805  
 тел.: +38 04343 6-10-56; www.enzim.biz

### Акт впровадження

**Назва пропозиції для впровадження:** матеріали дисертації „БІОТЕХНОЛОГІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*, ЇХ ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ”

**1. Установа, адреса, виконавець:** Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України, м. Львів, вул. Наукова 3а, м. н. с. відділу хімії і біотехнології горючих копалин, Покинсьброд Тетяна Ярославівна.

**2. Джерела інформації:**

1. Патент України на винахід № 71792 А (Заявка № 20031212346), 15.12.2004 Поверхнево-активний біопрепарат. Карпенко О.В., Мартинюк Н.Б., Шульга О.М., Покинсьброд Т.Я., Вільданова-Марцишин Р.І., Щеглова Н.С., Бюлл.12.
2. Пат. 36704 Україна МПК А01N 25/30 А01N 59/06 А01N 63/00 С12N 1/20. Біопрепарат для бобових і злакових рослин / Лісова Н., Карпенко О. В., Вільданова Р.І., Щеглова Н.С.; опубл. 10.11.2008, Бюл. №21.
3. Покинсьброд Т.Я., Карпенко О.В., Лубенець В. І., Мартинюк Н.Б., Зінь І.М. Біосинтез ПАР мікроорганізмами родів *Pseudomonas* на соєвій олії та дослідження їх властивостей // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». 2017. № 868. С. 222-229.

4. **Впроваджено:** Науково-дослідна лабораторія ДП «Ензим».

5. **Термін впровадження:** 2017 р

6. **Ефективність впровадження:** У науково-дослідній лабораторії була проведена низка робіт по вивченню антимікробної активності біогенних ПАР щодо низки фітопатогенних мікроорганізмів. Показано, що препарати на основі біоПАР штамів *Pseudomonas* мають сильні фунгіцидні властивості щодо грибів *A. alternata*, *F. oxysporum*, *Rh.cerealis*, *B.corokiniana*. Максимальні зони затримки росту виявлені для препаратів на основі СКР *Pseudomonas* sp. PS-17 і *P. fluorescens* 8573 – 2,7 см й 2,2 см (для *A. alternata*), 3,2 см і 2,8 см (для *F. oxysporum*) відповідно. Біофунгіцидні препарати з такими властивостями можуть мати великий попит на ринку засобів захисту рослин, але широке впровадження стане можливе за умови промислового випуску біоПАР.

Начальник Науково-дослідної  
 лабораторії ДП «Ензим»



*Handwritten signature of H.B. Martynuk*

Мартинюк Н.Б.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор ІНІ «Агро-Адмірал»

Л. М. Левчук  
2018 р.**А К Т**

впровадження результатів дисертаційної роботи

*Покиньброди Тетяни Ярославівни**«Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*,  
їх властивості та застосування»*

Поверхнево-активні продукти біосинтезу бактерій роду *Pseudomonas*, що отримані при виконанні дисертаційної роботи Покиньброди Тетяни Ярославівни «Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування», апробовані у польових умовах в господарствах Одеської області як регулятори росту рослин (пшениця, кукурудза, огірок, буряк). Отримані позитивні результати випробувань можуть бути застосовані для впровадження у рослинництво вітчизняних екологічно безпечних агрозасобів на основі поверхнево-активних продуктів біотехнології.

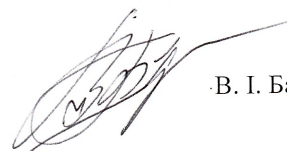
## А К Т

використання результатів дисертаційної роботи  
„Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*,  
їх властивості та застосування”  
*Покинсьброди Тетяни Ярославівни*

**Джерело впровадження:** Матеріали дисертаційної роботи та наукові публікації молодшого наукового співробітника відділу хімії і біотехнології горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М.Литвиненка НАН України **Покинсьброди Т.Я.** по темі «Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування», поданої на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю «Біотехнологія».

**Де впроваджується:** у науковій роботі та навчальному процесі студентів біологічного факультету Львівського національного університету ім. І. Франка у курсах лекцій «Фізіологія та біохімія рослин», а також у спецкурсі «Механізми адаптацій рослин», для студентів кафедри фізіології та екології рослин.

Доцент кафедри  
фізіології та екології рослин  
Львівського Національного університету  
ім. Івана Франка, канд. біол. наук



В. І. Баранов

Декан біологічного факультету  
Львівського національного університету  
ім. І. Франка, к.б.н., доцент



І.С. Хамар